

Verfahren zur Selektion von Biomolekülen aus Varianten-Bibliotheken von Biomolekülen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Selektion von Biomolekülen aus Varianten-
5 Bibliotheken von Biomolekülen, insbesondere von Enzymen oder anderen biokatalytisch aktiven Biomolekülen. Biomoleküle finden vielseitige Verwendung in technologischen oder medizinischen Anwendungen und Prozessen. Viele der dafür benötigten Eigenschaften der Biomoleküle sind in der Natur so nicht vorhanden oder noch nicht identifiziert worden. Die Generierung solcher neuen Eigenschaften aus
10 vorhandenen Biomolekülen erfordert die Herstellung sehr großer Varianten-Bibliotheken mit zufällig veränderten Zusammensetzungen durch Einführung von Mutationen. Die Identifizierung der Varianten mit den gesuchten Eigenschaften erfordert geeignete Selektions- oder Durchmusterungs-Verfahren.

15 Das zufällige Einführen von Mutationen in das genetische Material ist auch die Triebfeder der natürlichen Evolution. Natürliche Systeme replizieren dabei mit Mutationsraten, die gerade knapp unter der so genannten Fehlerschwelle liegen. Die Fehlerschwelle ist dabei die maximale Mutationssrate, die gerade nicht zum Aussterben der Population führt. Bei Mutationsraten unterhalb der Fehlerschwelle werden
20 genügend Variationen in einer Population angehäuft, um der Population eine schnell Anpassung an veränderte Bedingungen zu ermöglichen. Mutationsraten über der Fehlerschwelle führen hingegen nach einigen Generationen dazu, dass keine überlebensfähigen bzw. replizierbaren Individuen mehr vorhanden sind, und die Population zusammenbricht (Eigen, M., McCaskill, J., Schuster, P.: The molecular
25 quasispecies. *Adv. Chem. Phys.* 1989. 75. 149-263).

Neue Biomoleküle können durch die Verknüpfung der neuen Eigenschaft an das Überleben oder einen hinreichend großen Wachstumsvorteil eines Organismus erzeugt werden. Hierbei wird die Varianten-Bibliothek in einen entsprechenden Organismus
30 überführt und die Wachstumsbedingungen so gewählt, dass nur die Individuen überleben oder vergleichsweise schneller wachsen, welche eine Variante des Biomoleküls mit der gesuchten neuen Eigenschaft produzieren (Zaccolo M, Gherardi E.

The effect of high-frequency random mutagenesis on in vitro protein evolution: a study on TEM-1 beta-lactamase. J. Mol. Biol. 1999. 285, 775-83. oder Samuelson JC, Xu SY. Directed evolution of restriction endonuclease BstYI to achieve increased substrate specificity. J. Mol. Biol. 2002. 319, 673-83). Diese Anwendung ist nur auf die Selektion 5 eines eng begrenzten Kreis von Biomolekülen anwendbar, die einem gewählten Organismus einen Vorteil verschaffen können. Biomoleküle, welche beliebige chemische Reaktionen katalysieren, sind so nicht selektierbar. Da der Organismus über den gesamten Selektionszeitraum am Leben bleiben muss, sind toxische oder anderweitig für ein Wachstum nachteilige Eigenschaften nicht selektierbar.

10

Eine weitere Methode zur Selektion neuer Biomoleküle ist die Verknüpfung des Biomoleküls mit der codierenden Nukleinsäure-Sequenz (Amstutz P, Forrer P, Zahnd C, Pluckthun A. In vitro display technologies: novel developments and applications. Curr. Opin. Biotechnol. 2001. 12, 400-5. Xia G, Chen L, Sera T, Fa M, Schultz PG, 15 Romesberg FE. Directed evolution of novel polymerase activities: mutation of a DNA polymerase into an efficient RNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. 99, 6597-602. Pschorr J. Genotyp und Phänotyp koppelnde Verbindung. DE0019646372C1). Eine Anwendung dieser Technologien mit lebenden Organismen wie Phagen oder Bakterien beschränkt das Spektrum wiederum auf nicht toxische oder 20 nicht wachstumshemmende Biomoleküle. Ebenso dürfen Substrate und Produkte der gesuchten Reaktion auf den präsentierenden Organismus nicht schädigend einwirken. Zusätzlich lassen sich katalytische Aktivitäten nur selektieren, wenn sich Biomolekül und Substrat an dem gleichen Organismus präsentieren lassen. Da sich die Aktivität der katalytischen Biomoleküle nicht auf den sie präsentierenden Organismus begrenzen 25 lässt und diese somit auch Reaktionen an anderen Individuen der Bibliothek stattfinden können, führt diese Methode häufig zur Falsch-Selektion von Biomolekülen.

Bei den Durchmusterungs-Verfahren (Screening-Verfahren) wird jede Variante einer Biomolekül-Bibliothek einzeln hinsichtlich der gesuchten Eigenschaft untersucht. (Joo 30 H, Lin Z, Arnold FH. Laboratory evolution of peroxide-mediated cytochrome P450 hydroxylation. Nature. 1999. 399, 670-3. Korbel GA, Lalic G, Shair MD. Reaction microarrays: a method for rapidly determining the enantiomeric excess of thousands of

samples. J. Am. Chem. Soc. 2001. 123. 361-2.) Selbst bei sehr kurzen Messzeiten (z. B. 100 ms pro Variante) erfordert diese Methode einer sehr hohen Zeitaufwand (z.B. 22 Tage) für die Untersuchung großer Bibliotheken (z.B. 10^7). Das kontinuierliche Messen von Varianten in diesen Größenordnungen erfordert den Aufbau entsprechend komplexer Apparate. Außerdem muss für jede Variante der Bibliothek ein entsprechender Eigenschaftstest durchgeführt werden, was zu sehr hohen Kosten dieser Methoden führt.

10 Zum Screenen oder zur Veränderung von Enzymeigenschaften im Labor, dem sogenannten „Enzym Engineering“ müssen nach dem Stand der Techrik in einer Enzyrbibliothek Genotyp (eine Nukleinsäure, die vervielfältig werden kann und eine Variante eines Gens umfasst) und Phänotyp (ein funktionales Merkmal, wie z. B. eine katalytische Eigenschaft) aneinander gekoppelt werden. Diese Kopplung wird z. B. durch Techniken, wie Phage-Display oder Ribosomen-Display erreicht oder dadurch, 15 dass jeder Genotyp einzeln auf einen Phänotyp getestet wird.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es ein Verfahren zur Identifizierung von Biomolekülen in Varianten-Bibliotheken von Biomolekülen anzugeben.

20 Erfindungsgemäß wird die Aufgabe gelöst durch ein Verfahren zur Selektion von Biomolekülen aus Varianten-Bibliotheken von Biomolekülen umfassend die Schritte:

- a.) Herstellung einer Varianten-Bibliothek, bestehend aus einer Anzahl (B_0) von Varianten der für das Biomolekül codierenden Gensequenz,
- b.) Aufteilung der Variantenbibliothek in eine Anzahl von Kompartimenten (W_0), die bevorzugt um einen Faktor 10, mehr bevorzugt einen Faktor 100, kleiner ist als die Anzahl (B_0) der in der Varianten-Bibliothek enthaltenen Varianten, 25 wobei jedes Kompartiment eine Teilbibliothek enthält, die $K_0=B_0/W_0$ Varianten enthält,
- c.) Produktion von Biomolekülen in den Kompartimenten, und Test der in den einzelnen Kompartimenten erhaltenen Biomoleküle auf eine

bestimmte Eigenschaft (Phänotyp), bevorzugt eine biokatalytische Aktivität, wobei aus dem beobachteten Phänotyp keine direkten Rückschlüsse auf den Genotyp möglich sind,

- 5 d.) Auswahl mindestens eines Kompartiments, in dem Biomoleküle enthalten sind, welche die gewünschte Eigenschaft, bevorzugt eine biokatalytische Aktivität, erfüllen,
- e.) Aufteilung der in dem ausgewählten Kompartiment enthaltenen Teilbibliothek in weitere Kompartimente entsprechend Schritt b.) und
- 10 f.) n-faches Wiederholen der Schritte c.) bis e.) bis in jedem Kompartiment nur noch maximal eine Variante ($K_n \leq 1$) der für das Biomolekül codierenden Gensequenz enthalten ist.

15 Dieses Verfahren ist insbesondere zur Generierung von Biomolekülen mit neuen katalytischen Aktivitäten geeignet, die entweder in der Natur gar nicht vorkommen oder zumindest von dem gewählten Ausgangs-Biomolekül so nicht katalysiert werden. Außerdem können mit diesem Verfahren vorhandene katalytische Aktivitäten an äußere Bedingungen, wie z.B. Temperatur oder Lösungsmittel, angepasst werden, unter denen bisher keine oder nur verschwindend geringe Aktivität vorhanden war.

20 Da eine Produktion der Biomoleküle in der vorliegenden Erfindung zu einem Absterben der Organismen führen kann oder durch zellfreie Systeme erfolgen kann, kann das Verfahren auf alle Arten von Biomoleküle angewandt werden und ist nicht auf nicht toxische oder nicht wachstumshemmende Aktivitäten begrenzt. Da bis zu einer Million oder mehr Varianten mit einem Test und gleichzeitig auf die entsprechende Eigenschaft hin untersucht werden, reduziert sich die für das Durchmustern der Bibliothek benötigten Zeit und die für die Eigenschaftstests benötigten Kosten um einen entsprechenden Faktor. Varianten, welche die gesuchten Eigenschaften aufweisen, können sicher und reproduzierbar aus den ursprünglichen Varianten-Gemischen isoliert werden.

25 Im Schritt a.) des Verfahrens wird eine Varianten-Bibliothek der für das Biomolekül codierenden Gensequenz mittels Standardmethoden der Molekularbiologie hergestellt.

Unter Variantenbibliothek wird im Sinne der vorliegenden Erfindung verstanden: Mischung aus Proteinen oder Nukleinsäuren, welche sich in mindestens einer Position in ihrer Sequenz voneinander unterscheiden.

5 Bevorzugt besteht die Variantenbibliothek aus einer Anzahl von Varianten in einem Größenbereich von $B_0 = 10^3$ bis $B_0 = 10^{15}$. So können zum Beispiel in einen Teilbereich des Biomoleküls zufällig gewählte Sequenzbausteine eingeführt werden, so dass im Fall einer Nukleinsäure bei 25 geänderten Positionen eine Bibliotheksgröße von $4^{25} = 1,1 \times 10^{15}$ oder im Fall eines Proteins bei 7 geänderten Positionen eine Bibliotheksgröße von 10 $20^7 = 1,3 \times 10^9$ entstehen kann.

Besonders bevorzugt liegt der Größenbereich zwischen $B_0 = 10^5$ bis $B_0 = 10^9$.

Besonders bevorzugt besteht die Variantenbibliothek aus DNA-Plasmiden oder linearen Nukleinsäuremolekülen, welche die für das Biomolekül codierende Gensequenz enthalten.

15 Biomoleküle im Sinne des vorliegenden Erfindung sind Proteine, Nukleinsäuren oder andere aus organischen Bausteinen bestehende Biopolymere. Bevorzugt sind diese Biomoleküle, Enzyme oder Ribozyme oder andere Biomoleküle, die als Biokatalysatoren, die Umsetzung chemischer oder biochemischer Stoffe beschleunigen können.

20 Standardmethoden der Molekularbiologie mit denen eine solche Variantenbibliothek hergestellt werden kann, sind beispielsweise fehlerhafte Vervielfältigungsmethoden für Nukleinsäuren. Hierfür werden replizierende Enzyme, z.B. Polymerasen, welche die Neusynthese eines Biomoleküls mit Hilfe einer Matrize durchführen, angewandt. Die Einführung von Fehlern und somit die Erzeugung von unterschiedlichen Varianten erfolgt entweder durch die natürlich vorhandene Fehlerrate dieser replizierenden Enzyme oder kann durch Veränderung der Reaktionsbedingungen (z.B. Ungleichgewicht der Synthesebausteine, Zugabe von Baustein-Analoga, Veränderung der Puffer-Zusammensetzung) erhöht werden. Neben der Einführung von Fehlern kann

eine Variantenbibliothek unter Ausnutzung der natürlich vorkommenden Diversität für ein bestimmtes Biomolekül oder eine Biomolekülklasse erzeugt werden.

Im Vergleich zu herkömmlichen Screeningverfahren erlaubt das erfindungsgemäße Verfahren das Screening von sehr großen Bibliotheken. Das erfindungsgemäße 5 Aufteilungsverfahren ermöglicht das gleichzeitige Testen von beliebig vielen Varianten.

Limitiert wird die Größe der Bibliothek nur durch die Sensitivität des Assays, mit dem die in den einzelnen Kompartimenten erhaltenen Biomoleküle auf eine bestimmte Eigenschaft, bevorzugt eine biokatalytische Aktivität, in Schritt c.) des Verfahrens getestet werden.

10 Vorzugsweise werden die Bibliotheken durch fehlerhafte PCR oder das Einfügen synthetisch randomisierter Sequenzabschnitte hergestellt (Cadwell RC, Joyce GF. Randomization of genes by PCR mutagenesis. PCR Methods Appl. 1992. 2. 28-33; (Wells JA, Vasser M, Powers DB. Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites. Gene. 1985. 34. 315-23)).

15 Die Mutationsrate wird dabei bevorzugt deutlich über der Fehlerschwelle gewählt. Dadurch sind in der Ausgangsbibliothek bevorzugt mehr als 90 %, bevorzugt mehr als 99 % und besonders bevorzugt mehr als 99,9 % der erstellten Varianten nicht überlebensfähig sind.

Die Fehlerschwelle ist definiert als die maximale Mutationsrate, die bei evolutionären 20 Methoden (zyklische Anwendung von Mutation und Selektion) gerade nicht zu einem Zerfließen der genetischen Information führt und somit die Überlebensfähigkeit einer Population erhält. Ein Zerfließen der genetischen Information wird definiert als ein Vorgang, bei dem durch wiederholtes Anlegen einer zu hohen Mutationsrate beim Replizieren einer Nukleinsäuresequenz sich so viele Mutationen anhäufen, dass die 25 Nukleinsäure dann keine physiologisch sinnvolle Information mehr enthält.

Überlebensfähigkeit für ein Gen bzw. Genprodukt wird dabei so definiert, dass das Gen bzw. sein Genprodukt seine physiologische Aktivität wie zum Beispiel die Bindung eines Partners oder die katalytische Spaltung eines Substrates noch wahrnehmen kann.

Ein wichtiger Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahren gegenüber etablierten

5 Verfahren, die Mutagenese- und Selektionsschritte enthalten, besteht darin, dass im erfindungsgemäßen Verfahren von einer großen Bibliothek ausgegangen wird, die von vornherein die gewünschte Variante enthält. D. h. man erhält nach dem Screening nicht eine suboptimale Variante, die durch weitere Mutations- oder Rekombinationszyklen weiter verbessert werden muss.

10 Das erfindungsgemäße Verfahren zeichnet sich dadurch aus, dass zu Beginn einmalig im Schritt a.) eine Varianten-Bibliothek erstellt wird, welche im Anschluss auf Varianten mit der gewünschten Eigenschaft durchmustert wird. Ab dem Schritt b.) erfolgen keine weiteren Mutagenese oder Rekombinationschritte. D. h. zwischen oder während den einzelnen Vereinzelungsschritten (Schritte b. bis f.) werden die dabei 15 isolierten Teilbibliotheken keiner weiteren Mutagenese oder Rekombination unterzogen. D. h. die am Ende des Verfahrens isolierten Varianten mit den gewünschten Eigenschaften sind bereits in der initialen (in Schritt a.) eingesetzten Bibliothek vorhanden.

20 Bevorzugt wird das erfindungsgemäße Verfahren so durchgeführt, dass in Schritt d.) in allen Durchgängen nur ein Kompartiment ausgewählt wird und zwar das in dem die gewünschte Eigenschaft (Phänotyp) am stärksten ausgeprägt ist, vorzugsweise das Kompartiment mit der stärksten biokatalytischen Aktivität. Dabei kann mit dem erfindungsgemäßen Verfahren die beste Variante isoliert werden, in der die gewünschte 25 Eigenschaft (Phänotyp) am stärksten ausgeprägt ist, ohne dass eine Auswahl von suboptimalen Varianten oder von Gruppen von Varianten zwingend erforderlich ist.

Bei dem Erstellen der Variantenbibliothek wird vorzugsweise von einer bereits bekannten Nukleinsäure- oder Proteinsequenz ausgegangen, nachfolgend Ausgangssequenz genannt. Basierend auf dieser Ausgangssequenz wird mit den oben

genannten Methoden (z. B. fehlerhafter PCR oder durch das Einfügen synthetisch randomisierter Sequenzabschnitte) die Variantenbibliothek hergestellt

Das erfindungsgemäße Verfahren zeichnet sich weiterhin dadurch aus, dass die Ausgangssequenz nicht mehr in der Variantenbibliothek enthalten sein muss.

- 5 Die Ausgangsequenz codiert häufig für einen Phänotyp der der gewünschten Eigenschaft zu einem gewissen Grade ähnlich ist. So wird man, z. B. wenn man als gewünschte Phänotyp eine RNase erhalten will, die hinter einem Adenosin schneidet, als Ausgangssequenz z. B. eine RNase, die hinter einem Guanosin schneidet, wählen (und nicht etwa eine Protease).
- 10 Umso ähnlicher die Ausgangsequenz in ihrem Phänotyp der gewünschten Eigenschaft jedoch ist, desto größer ist jedoch in der Regel auch die Hintergrundsaktivität in dem Test in Schritt c.) des Verfahrens. Vorteilhaft wird dieser Hintergrund vermieden, wenn die Ausgangssequenz nicht mehr in der Variantenbibliothek enthalten ist.

Bevorzugt wird die Variantenbibliothek daher so hergestellt, dass die Ausgangsvariante 15 nicht mehr in der Variantenbibliothek enthalten ist. Dies kann zum Beispiel dadurch erreicht werden, dass in die Ausgangssequenz ein Stop-Codon eingefügt wird, welches durch das Einsetzen der mutierten Abschnitte in die Ausgangssequenz wieder entfernt wird. Somit wird sichergestellt, dass eventuell verschleppte Ausgangssequenzen durch 20 das Stop-Codon physiologisch nicht aktiv sind und auf der anderen Seite, physiologisch aktive Varianten mutierte Bereiche enthalten müssen.

Im Gegensatz zu den nach dem Stand der Technik eingesetzten High-Throughput-Verfahren ermöglicht das erfindungsgemäße Verfahren ein Durchsuchen von um ein Vielfaches größerer Bibliotheken in einem Bruchteil der Zeit. Im Vergleich zu *in vivo* Selektionsverfahren ist das erfindungsgemäße Verfahren auch nicht limitiert auf 25 bestimmte Enzymklassen bzw. bestimmte Enzymeigenschaften.

Im Schritt b.) wird die Variantenbibliothek in eine Anzahl W_0 von Kompartimenten, die mindestens um einen Faktor 10, bevorzugt einen Faktor 100, kleiner ist, als die Anzahl der in der Varianten-Bibliothek enthaltenen Varianten, aufgeteilt.

Hierbei kann vor der Aufteilung die Überführung der Variantenbibliothek in einen 5 Organismus erfolgen oder die Aufteilung auf Ebene der codierenden Sequenzen erfolgen. Die Aufteilung erfolgt so, dass jede Variante der Bibliothek mindestens einmal, bevorzugt genau einmal, vorkommt.

Die dann im Schritt c.) durchgeführte Produktion (Expression) der Biomoleküle erfolgt bevorzugt durch den Organismus oder durch *in vitro* Expressionssysteme (z.B. 10 Zellextrakte).

Als Expressions-Organismus kommen alle in der Molekularbiologie standardmäßig zu Expression von Biomolekülen, wie Proteinen, verwendeten Organismen in Betracht, der Expressionsorganismus wird dabei in Abhängigkeit des zu exprimierenden Biomoleküls gewählt. Bevorzugte Expressionsorganismen sind bakterielle Zellen (z.B. *E. coli*, *B. 15 subtilis*) oder eukaryontische Zellen (z.B. *S. cerevisiae*, Insektenzellen, Tumorzellen).

Durch die Überführung der Variantenbibliothek in den Expressionsorganismus entstehen einzelne Klone des Expressionsorganismus. Dabei enthält ein Klon jeweils einen definierten Genotyp, d. h. eine Variante der für das Biomolekül codierenden Gensequenz. Ein Klon kann im Sinne der vorliegenden Erfindung auch durch eine 20 alleinige codierende Sequenz definiert sein, d. h. einen definierten Genotyp ohne Expressionsorganismus.

Diese Überführung in einen Organismus geschieht durch die bekannten Methoden der Molekularbiologie für die Transformation von Gensequenzen in Expressionsorganismen und ist abhängig von dem verwendeten Expressionsorganismus. Eine bevorzugte 25 Methode ist die Elektroporation.

Bevorzugt erfolgt die Aufteilung in Kompartimente sofort nach der Überführung der Variantenbibliothek in den Expressionsorganismus.

Die Anzahl W_0 der Kompartiment beträgt bevorzugt zwischen 10^1 und 10^4 Kompartimenten und besonders bevorzugt zwischen 96 und 1536 Kompartimenten.

Die Bibliotheksgröße B_0 dividiert durch die Kompartiment-Anzahl W_0 ergibt die Klon-Anzahl K_0 pro Kompartiment, $K_0 = B_0 / W_0$.

5 Jedes Kompartiment enthält eine Teilbibliothek mit einer Anzahl von K_0 Varianten der für das Biomolekül codierenden Gensequenz.

Besonders bevorzugt erfolgt die Aufteilung in die Kompartimente einer Mikrotiter- bzw. Deepwellplatte mit $W_0 = 96$ Kompartimenten

10 Bevorzugt erfolgt im Schritt c.) eine Vervielfältigung der Teilbibliotheken in den Kompartimenten durch Wachstum der Organismen oder Vervielfältigung der codierenden Sequenzen durch Matrizen-abhängige Enzyme bis zu einer Individuen-Anzahl V_0 pro Kompartiment und Produktion der katalytischen Biomoleküle durch die Expressionsorganismen oder zellfreie Expressionssysteme, wie z.B. *E. coli* Lysate, Reticulocyten-Lysate, *C. lucknowese* Lysate oder Insektenzellen-Lysate.

15 Bevorzugt erfolgt nun eine Konservierung eines Anteils der Teilbibliothek auf Organismen-Ebene oder der Ebene reiner codierender Sequenzen zum Zeitpunkt x unter Beibehaltung der Kompartiment-Zuordnung.

20 Die Konservierung von Organismenkulturen erfolgt bevorzugt durch die Herstellung einer 1:1 Mischung aus Organismen-Kultur und Glycerol und Lagerung dieser Mischung unter Wachstumsinhibition bei -80°C . Eine Konservierung auf Ebene der codierenden Sequenzen erfolgt durch Abnahme eines Anteils der vervielfältigten Sequenzen und Lagerung, bevorzugt bei -20°C .

25 Eine Bestimmung der Individuen-Anzahl $V_0(x)$ der konservierten Teilbibliothek auf Organismen-Ebene erfolgt bevorzugt durch Messung der optischen Dichte OD einer flüssigen Organismen-Kultur und Korrelation mit der Individuen-Anzahl oder Überführung eines Aliquot dieser Kultur auf ein Festmedium und Auszählen der daraus resultierenden Kolonien. Die Bestimmung der Individuen-Anzahl $V_0(x)$ der

konservierten Teilbibliothek auf Ebene codierender Sequenzen erfolgt bevorzugt durch Konzentrationsbestimmung mittels spektroskopischer Methoden.

Die Individuen-Anzahl $V_0(x)$ dividiert durch die Klonanzahl pro Kompartiment K_0 ergibt den Vervielfältigungsfaktor $F_0(x)$ pro Klon, $F_0(x) = V_0(x) / K_0$.

5 Im Schritt c.) des Verfahrens werden die in den einzelnen Kompartimenten enthaltenen Biomoleküle auf eine bestimmte Eigenschaft (Phänotyp), bevorzugt eine biokatalytische Aktivität, getestet.

Bevorzugt erfolgt in Schritt c.) eine Vervielfältigung der Teilbibliothek in den Kompartimenten bis zu einer Individuen-Anzahl $V_0(x)$ zum Zeitpunkt x pro 10 Kompartiment, wobei die Individuen-Anzahl $V_0(x)$ dividiert durch die Klonanzahl pro Kompartiment K_0 den Vervielfältigungsfaktor $F_0(x)$ pro Klon ergibt.

Vor, während oder nach dem Wachstum der Organismen oder der Vervielfältigung der Genotypen erfolgt dabei die Produktion der Biomoleküle in den einzelnen 15 Kompartimenten.

Bevorzugt erfolgt der Test auf eine biokatalytische Aktivität durch Inkubation der in dem Kompartiment enthaltenen oder aus diesen isolierten katalytisch aktiven Biomoleküle mit entsprechenden Substraten und Zuordnung von Aktivitätswerten zu 20 den jeweiligen Kompartimenten. Kompartimente in denen der Aktivitätswert eine definierte Schwelle überschreitet, werden als positiv gewertet.

Da jedes Kompartiment mehr als einen Klon der Variantenbibliothek enthält, lässt sich aus dem beobachteten Phänotyp keine direkten Rückschlüsse auf den Genotyp machen, da der beobachtete Phänotyp durch die Summe der im Kompartiment enthaltenen Klone 25 resultiert.

Obwohl im erfindungsgemäßen Verfahren daher Genotyp und Phänotyp entkoppelt sind lässt sich mit dem erfindungsgemäßen Verfahren der für die gewünschte Eigenschaft verantwortliche Klon, der zum Beispiel die gewünschte Enzymaktivität enthält, aus dem Gemisch der Klone wiederfinden und isolieren. Dass es möglich ist mit einem

Screeningverfahren bei dem Genotyp und Phänotyp entkoppelt sind, den für die gewünschte Eigenschaft verantwortlichen Klon aus dem Gemisch der Klone wiederzufinden und zu isolieren ist für die Fachwelt überraschend, da alle bekannten Screeningverfahren auf der Kopplung von Genotyp und Phänotyp beruhen.

5 Den Klon mit der gewünschten Eigenschaft wiederzufinden wird durch die Schritte d.), und e.) des erfindungsgemäßen Verfahrens erreicht.

Im Schritt d.) des Verfahrens wird mindestens ein Kompartiment ausgewählt in dem Biomoleküle enthalten sind, welche die gewünschten Eigenschaften erfüllen.

10 Die in diesem Kompartiment enthaltene Teilbibliothek wird nun im Schritt e.) des Verfahrens entsprechend Schritt b.) erneut in Kompartimente aufgeteilt

Vorzugsweise wird dazu die Teilbibliothek oder die entsprechende konservierte Teilbibliothek anhand des Faktor $F_0(x)$ so verdünnt, dass in einem gegebenen Volumen jeder in dem Kompartiment enthaltene Klon statistisch bis zu einer Anzahl $X_0 < W_1$ vorkommt. Dieses Volumen wird wiederum ohne vorherige Vervielfältigung auf neue 15 Kompartimente der Anzahl W_1 aufgeteilt. Die neue Klonanzahl pro Kompartiment $K_1 = X_0 * K_0 / W_1$.

Nun werden die Schritte c.) bis e.) des Verfahrens solange wiederholt bis die Anzahl der Klone pro Kompartiment $K_n \leq 1$. Sobald $K_n \leq 1$ erreicht ist, ist der gesuchte Phänotyp einen einzelnen Genotyp zugeordnet.

20 Um den Verlust von Einzelklonen und somit Varianten der Bibliothek von Biomolekülen zu verhindern, wird der Schritt e.) bevorzugt in der Weise ausgeführt, dass in den ersten Durchläufen des Schritts e.) $1 < X_{n-1} < W_1$ gilt, bevorzugt $X_{n-1} = 3$ bis 5.

Der Schritt e.) wird bevorzugt solange wiederholt, bis der den gesuchten Phänotyp 25 verursachende Klon innerhalb der neu-kompartimentierten Teilbibliothek zu finden ist. Hierbei ist bevorzugt im letzten Durchlauf des Schritts e.) $X_n < 1$. Vorzugsweise wird dazu bei der letzten Durchführung des Schrittes e.) die Teilbibliothek so verdünnt, dass

maximal ein Klon pro Kompartiment zu finden ist und in vielen Kompartimenten kein Klon mehr enthalten ist. Damit gibt sich ein durchschnittlicher Wert von $X_n < 1$.

Im Schritt f.) werden die Schritte c.) bis e.) n-fach wiederholt bis in jedem Kompartiment nur noch maximal eine Variante ($K_n \leq 1$) der für das Biomolekül 5 codierenden Gensequenz enthalten ist.

Die Anzahl der nötigen Wiederholungen n ist dabei abhängig von der Anzahl von Varianten (B_0) der in Schritt a.) eingesetzten Varianten-Bibliothek, der Anzahl der Kompartimente (W_n) in welche die Bibliotheken in Schritt b.) und e.) aufgeteilt werden und der Anzahl X_n , mit der ein einmal gefundener Klon im nächsten Zyklus 10 wiedervorhanden ist. Die Anzahl der durchgeführten Wiederholungen n beträgt dabei bevorzugt bei konstantem $X_n = 1$ und konstantem W_n :

$$n = \log_{10}(B_0) - \log_{10}(W_n) \quad \text{oder} \quad n = (\log_{10}(B_0) - \log_{10}(W_n)) + 1,$$

wobei gegebenenfalls n auf die nächst höhere ganze Zahl aufgerundet wird.

Wird in Schritt a.) z. B. eine Bibliothek mit $B_0 = 10^6$ Varianten eingesetzt und werden 15 die Teilbibliotheken in Schritt b.) und e.) jeweils mit $X_n = 1$ in $W_n = 96$ oder $W_n = 100$ Kompartimente aufgeteilt, sind n = 4 bis 5 Durchläufe der Schritte c.) bis e.) notwendig, um den Klon mit der gewünschten Aktivität wiederzufinden.

Anhand der nachfolgenden Ausführungsbeispiele wird die Erfindung näher erläutert:

Ausführungsbeispiel 1 beschreibt als Beispiel die Selektion von aktiver RNase T1 aus einer Variantenbibliothek von inaktiven Varianten von RNase T1.

Ausführungsbeispiel 2 beschreibt als Beispiel die Selektion einer nach Adenosin 5 spaltenden RNase T1 aus einer Bibliothek von RNase T1-Varianten

Ausführungsbeispiel 1

1. Klonierung der Gene für RNase T1 Wildtyp und His92Ala

Mit den beiden Primern A2Vo_BspHI (SEQ_ID No. 1) und A2Hi_PstI (SEQ_ID No. 2) (beide IBA Göttingen) werden die für RNase T1 Wildtyp (SEQ_ID No. 3) und die 10 RNase T1 Variante His92Ala (SEQ_ID No. 4) codierenden Gene inklusive des Signalpeptides für eine periplasmatische Expression aus dem jeweiligen Ursprungsvektoren pA2T1 (SEQ_ID No. 5) und pA2T1_H92A (SEQ_ID No. 5, in dem SEQ_ID No. 3 durch SEQ_ID No. 4 ersetzt ist) durch eine PCR unter den nachfolgenden Bedingungen amplifiziert.

15 1.1 PCR:

PCR-Ansatz:	10 µl	10x VENT-Puffer (NEB, Beverly, USA)
	2 µl	dNTPs (je 10 mmol/Liter)
	100 pmol	Primer A2Vo_BspHI (SEQ_ID No. 1)
	100 pmol	Primer A2Hi_PstI (SEQ_ID No. 2)
20	1 µl	Ursprungsvektor (20 ng) (SEQ_ID No. 5)
	2 U	VENT-Polymerase (NEB)
	ad 100 µl	H ₂ O dest.

Temperaturprofil der PCR: 2 min / 94 °C

25	1.	45 sec / 94 °C (Denaturierung)	} 25 x
	2.	45 sec / 57 °C (Anlagerung)	
	3.	30 sec / 72 °C (Elongation)	
	2 min / 72 °C		

Die resultierenden PCR-Produkte werden mittel des QIAquick PCR-Reinigungs-Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellervorschrift gereinigt.

1.2 Restriktionsverdau:

Zur Klonierung der Gene in den Expressionsvektor pETBlue-2 (SEQ_ID No. 6) werden 5 die PCR-Produkte und der Vektor mittels Restriktionsendonukleasen BspHI und PstI bzw. NcoI und PstI (alle MBI Fermentas, Vilnius, Litauen) wie folgt inkubiert:

Restriktionsverdau-Ansätze:

10	PCR-Produkte:	Vektor:
	2 µg PCR-Produkt	4 µg pETBlue-2
	2 µl 10x Puffer O ⁺ (MBI)	2 µl 10x Puffer Y ⁺ (MBI)
	10 U BspHI	10 U NcoI
15	10 U PstI	10 U PstI
	ad 20 µl H ₂ O dest.	ad 20 µl H ₂ O dest.

Die Restriktionsverdau-Ansätze werden 2 h bei 37 °C inkubiert. Zu dem „Vektor-Ansatz“ wird anschließend zur Dephosphorylierung 1 U SAP (MBI Fermentas, Vilnius, 20 Litauen) hinzu gegeben und für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden die Enzyme für 20 min bei 80 °C inaktiviert. Daraufhin werden die Produkte mittels des QIAquick PCR-Reinigungs-Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

1.3 Ligation, Transformation in *E. coli* und Plasmid-Reisolation

Die Vektor-DNA und das PCR-Produkt werden durch die Inkubation mit T4-DNA- 25 Ligase wie folgt miteinander verbunden:

	Ligase-Ansatz:	200 fmol	Vektor-DNA
		600 fmol	PCR-Produkt
		3 µl	10x Ligase-Puffer (MBI)
30		1 µl	T4-DNA-Ligase
		ad 30 µl	H ₂ O dest.

Die Ansätze werden 8 h bei 16 °C inkubiert und anschließend wurde das Enzym durch 10-minütige Inkubation bei 65 °C inaktiviert. 1 µl dieses Ansatzes wurde direkt zur Transformation kommerziell erhältlicher kompetenter ElectroTen-Zellen (Stratagene, La Jolla, USA) mittels Elektroporation eingesetzt. Die elektroporierten Zellen wurden 5 auf Festagar-Platten mit Ampicillin ausplatiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Ausgehend von einer resultierenden Einzelkolonie wird das fertige Plasmid mittels des Plasmid-Reinigungskits QIAprep Minipräparations-Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellervorschrift reisoliert.

1.4 Herstellung einer Plasmid-Mischung als RNase T1-Testbibliothek:

10 Als Resultat aus den vorangegangenen Schritten werden die beiden Plasmide pETBlue-RNaseT1-Wildtyp und pETBlue-RNaseT1-His92Ala erhalten.

Zur Herstellung einer Testbibliothek werden die Plasmide wie folgt gemischt:

15 1 pg pETBlue-RNaseT1-Wildtyp wird mit 1 µg pETBlue-RNaseT1-His92Ala gemischt. Dadurch erhält man ein Verhältnis von 1 : 1.000.000 aus RNase T1 Wildtyp (aktiv) und der Variante His92Ala (inaktiv).

1.5 Herstellung des Expressionsstammes:

Für die Expression der RNase T1-Testbibliothek wird ein *E. coli* Stamm benötigt, bei dem die RNase I ausgeschaltet ist. Entsprechende Stämme, wie z. B. AT9 (rna-19 λ⁻ gdhA2 relA1 spotT1 metB1) sind über das *E. coli* Genetic Stock Center New Haven, 20 USA verfügbar. Der im Beispiel verwendete Expressionsvektor pETBlue-2 benötigt zusätzlich die T7-RNA-Polymerase für die Expression, welche in *E. coli* nicht vorhanden ist. Mit dem kommerziell erhältlichen λDE3-Lysogenisierungs-Kit (Novagen, Madison, USA) wird nach Herstellervorschrift das T7-RNA-Polymerase codierenden Gen in den *E. coli* Stamm AT9 eingeführt. Hierdurch erhält man einen *E. coli* Stamm, der sich durch die Abwesenheit von RNase I und das Vorhandensein der T7-RNA-Polymerase (DE3) auszeichnet. Von diesem Stamm wurden mittels Standard-Molekularbiologie-Methoden elektrokompetente Zellen hergestellt und bei -80 °C 25 gelagert.

1.6 Transformation des Expressionsstammes mit der Testbibliothek:

In den wie oben beschrieben hergestellten Expressionsstamm wird 1 ng der Plasmid-Mischung als Testbibliothek mittels Elektroporation transformiert und die resultierenden Zellen nach 1-stündigem Wachstum bei 37 °C in 10 ml Flüssigmedium

5 (LB-Medium: 10 g Trypton, 5 g Hefe-Extrakt (alles Becton Dickinson, Heidelberg), 10 g NaCl (Sigma, Deisenhofen)) mit Ampicillin aufgenommen

Die so erhaltene Vorkultur wird sofort auf eine 96-Well Mikrotiterplatte (MTP) aufgeteilt (je 100 µl pro well) und über Nacht bei 30 °C und 800 Upm inkubiert.

10 Durch die Transformationen mittels Elektroporation werden ca. 3 Millionen transformierte Klone erhalten.

1.7 Wachstum der Hauptkultur und Expression von RNase T1

Eine 96er Deepwellplatte (DWP) wird mit jeweils 1,5 ml Flüssigmedium mit Ampicillin pro Well befüllt. Das Medium wird mit jeweils 50 µl aus der Vorkultur-

15 MTP beimpft und die DWP bei 37 °C und 800 Upm kultiviert. Beim Erreichen einer optischen Dichte OD₆₀₀ der Kulturen von OD₆₀₀ = 1,0 werden die Kulturen mit 1 mmol/Liter IPTG induziert. Anschließend wird die Platte für weitere 4 h bei 37 °C und 800 Upm inkubiert.

1.8 Präparation der Protein-Proben

Durch das Signalpeptid ompA werden die exprimierten RNase T1 – Moleküle in den 20 periplasmatischen Raum des Expressionsbakteriums geleitet. Durch einen osmotischen Schock können die Proteine sehr leicht präpariert werden. Die Reinigungsprozedur umfasst dabei folgende Schritte:

- Sammeln der Zellen durch Zentrifugation bei 4000 Upm, 4 °C für 5 min,
- Abschütteln des Medien-Überstandes,
- Resuspension des Bakterienpellets in jeweils 25 µl Puffer A (50 mmol/Liter Tris/HCl, pH 7,5, 10 mmol/Liter EDTA, 15 % Saccharose w/v),
- Inkubation auf Eis für 30 min,
- Zugabe von jeweils 125 µl Puffer B (50 mmol/Liter Tris/HCl, pH 7,5, 10 mmol/Liter EDTA),
- Zentrifugation bei 4000 Upm, 4 °C, für 20 min,
- Abnahme des Überstandes und Überführung in eine MTP (Periplasma),

- Aufbewahren der Bakterienpellets.

1.9 Herstellung des Substrates für RNase T1

Als Substrat (Sub_G) dient ein doppelsträngiges DNA-Molekül mit zentralem einzelsträngigen Bereich, welcher einen Guanosin-RNA-Baustein (rG) als

5 Angriffspunkt für das Enzym enthält. Die Enden dieses Substrates sind mit unterschiedlichen Farbstoffen für den roten (Cy5 am 5'-Ende) und den grünen (RhG am 3'-Ende) Spektralbereich markiert. Um ein Ausbleichen der markierten Substrate zu verhindern, werden die entsprechenden Lösungen und Inkubationsansätze stets vor 10 Licht geschützt. Die Puffer und Ansätze werden mit DEPC-behandeltem Wasser hergestellt. Das Substrat setzt sich aus den folgenden 3 Oligonucleotiden (IBA 15 Göttingen) zusammen:

1. Sub_G:

5'-Cy5-CCATACCAGCCAGCCACAArGCAAGCCACCGAACAGACAGATA-RhG-3'
(SEQ_ID No. 10)

15 2. T1_Sub_Li:

5'-GTGGCTGGCTGGTATGGA-3' (SEQ_ID No. 7)

3. T1_Sub_Re:

5'-TATCTGTGCTTCGGTGGC-3' (SEQ_ID No. 8)

Durch die nachfolgend beschriebene Hybridisierung werden die 3 Bestandteile wie folgt 20 zu einem doppelsträngigen Substrat aneinander angelagert:

Hybridisierungs-Ansatz:

1000 pmol Sub_G
1200 pmol T1_Sub_Li
1200 pmol T1_Sub_Re
25 20 µl MES (1 mol/Liter, pH 6,0)
ad 1000 µl DEPC-H₂O

Hybridisierungs-Programm:

1. 10 s 94°C;
2. Abkühlen auf 25 °C mit 0,1 °C/s
3. 4 °C

1.10 Inkubation der Protein-Proben mit dem Substrat

In einer MTP werden jeweils 10 µl des doppelsträngigen Substrates pro Well vorgelegt.

30 Dazu werden jeweils 10 µl der aus dem Periplasma isolierten Protein-Proben hinzugegeben, die MTP luftdicht verschlossen und dunkel für 24 h bei 37 °C inkubiert.

Anschließend werden jeweils 5 µl dieser Ansätze in eine MTP mit Glasboden überführt und mit jeweils 250 µl Puffer C (100 mmol/Liter MES, pH 6,0, 100 mmol/Liter NaCl, 2 mmol/Liter EDTA) gemischt.

1.11 Aktivitätsbestimmung

5 Zur Bestimmung der Enzymaktivität wird die Platte mit Glasboden, in die die Inkubationsansätze wie unter 1.10 beschrieben überführt wurden, am Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskop ConfoCor 2 (Evotec Biosystems, Hamburg und Carl Zeiss Microscopy, Jena) vermessen. Die Auswertung der Daten erfolgt mit der ConfoCor 2-Software (Version 2.5).

10 Für die Messungen wird ein Argon-Laser ($\lambda = 488$ nm) zur Anregung von RhG in Kombination mit einem Helium/Neon-Laser ($\lambda = 633$ nm) für Cy5 eingesetzt. Das FCS-Messvolumen in den Kavitäten wurde 200 µm über der Glasbodenoberfläche justiert. Die Messungen erfolgen für 20 s pro Well.

Durch eine Kreuzkorrelationsanalyse der erhaltenen Daten kann auf eine eventuelle

15 Spaltung des Substrates geschlossen werden. Eine Spaltung des Substrates durch RNase T1 führt zu einer Entkopplung der beiden Fluoreszenzfarbstoffe und somit zum Verlust des Kreuzkorrelationssignales. Ungeschnittene Substrat-Moleküle tragen hingegen beide Farbstoffe und liefern ein hohes Signal.

Durch die Aufteilung der durch die Transformation erhaltenen 3 Millionen Klone und

20 das Mischungsverhältnis zwischen aktiver RNase T1 Wildtyp und inaktiver RNase T1 His92Ala von 1 : 1.000.000 sollten theoretisch 3 Wells mit Aktivität durch die Messungen detektierbar sein. Statistische Abweichungen zwischen 1 bis 5 Wells mit Aktivität sind jedoch möglich.

25 **Fig. 1** zeigt die so erhaltenen Messdaten für ein nach Punkt 1 bis 1.11 hergestellte RNase T1-Testbibliothek bestehend aus 3 Millionen Klonen auf einer Platte mit einem Mischungsverhältnis von RNase T1 Wildtyp und RNase T1-His92Ala von 1 : 1.000.000. Die RNase T1-Aktivität wurde wie oben beschrieben mittels Kreuzkorrelationsanalyse detektiert. Für eine bessere Übersicht wurde eine reziproke

30 Darstellung gewählt, d.h. hohe Peaks bedeuten ein niedriges Signal und niedrige Peaks ein hohes Signal. **Fig. 1** zeigt 2 deutliche Peaks, die durch einen Verlust des

Kreuzkorrelationssignals hervorgerufen werden. Diese beiden Peaks zeigen, dass in dem Experiment eine RNase T1-Aktivität in zwei von 96 Wells sicher vorhanden war.

2. Reisolation der Teilbibliothek

5 In der nach Punkt 1 erhaltenen Platte mit den aufbewahrten Bakterienpellets aus der Proteinpräparation wird in einem der Wells, welche in der Aktivitätsbestimmung (Punkt 1.11) eine RNase T1-Aktivität gezeigt hat, eine Plasmidpräparation mittels dem QIAprep Minipräparations-Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt.
Durch die ursprüngliche Aufteilung von 3 Millionen Klonen auf die Platte ergab sich
10 eine Anzahl von $3.000.000 / 96 = 31.250$ unterschiedlichen Klonen pro Well. Es besteht somit in der isolierten Teilbibliothek ein Mischungsverhältnis von RNase T1 Wildtyp zu RNase T1 His92Ala von 1 : 32.250.

2.1 Weitere Vereinzelungen

15 Durch eine Transformation von verschiedenen Aliquots der so erhaltenen Teilbibliothek analog der vorgehensweise von Punkt 1.6 wurde die Menge von Plasmid-DNA bestimmt, welche notwendig ist, um nun ca. 100.000 transformierte Klone mittels Elektroporation zu erhalten.

20 Anschließend wurde die bestimmte Menge der Teilbibliothek in den Expressionsstamm transformiert und das gleiche Verfahren wie für die ursprüngliche Testbibliothek durchlaufen. Da ca. 100.000 Klone aufgeteilt wurden und das neue Mischungsverhältnis 1 : 32.250 betrug, waren wieder theoretisch 3 Wells mit detektierbarer Aktivität zu erwarten.

25 Die Plasmide wurden wiederum in einer der Wells mit Aktivität aus dem Bakterienpellet reisoliert. Das Mischungsverhältnis in dieser erneut angereicherten Teilbibliothek war nun $100.000 / 96 = 1050$.

30 Eine weitere Wiederholung des dargestellten Schemas mit einer Aufteilung von jetzt ca. 3000 Klonen ergab eine nochmals angereicherte Teilbibliothek mit einem Mischungsverhältnis von $3000 / 96 = 31$.

Indem von dieser letzten Teilbibliothek 96 Klone auf eine MTP aufgeteilt wurden, resultierten daraus 3 Wells mit Aktivität. Da diese Aktivitäten nun jeweils von einem

vereinzelten Klon verursacht wurden, konnte diesem die Aktivität von RNase T1 Wildtyp direkt zugeordnet werden.

Ausführungsbeispiel 2

5 Wildtyp RNase T1 spaltet RNA hoch spezifisch nach Guanosin-Resten. Zielstellung dieses Ausführungsbeispiels ist es RNase T1 Varianten, die RNA nach Adenosin-Resten spalten können, zu erhalten. Hierfür wurde eine RNase T1-Bibliothek erstellt und nach entsprechenden Varianten durchmustert.

1. Design der Bibliothek

10 Der zu mutierende Bereich des Guanin-Bindungsloops 1 umfasst die Aminosäuren 41 bis 57 von RNase T1 Wildtyp (SEQ_ID No. 3). Die Loop 1-DNA-Sequenz wird durch ein entsprechend synthetisiertes Mutagenese-Oligodesoxynucleotid Loop1_32 (SEQ_ID No. 9) so mutiert, dass je Variante 3 bis 4 der 17 Aminosäuren zufällig durch andere ersetzt werden. Dazu wird folgende Sequenz synthetisiert:

15 5' -GTAGGATCCAATTCTTACCCACAC aay tax aax aax tax gay ggz ttz gaz
ttx tcz gty agx tcz ccx tax tax GAATGGCCTATCCTCTCGAGCGG-3'

20 in der „n“ (A, G, C oder T - „any“) und „b“ (G, C oder T – nicht A) aus SEQ_ID No. 9 wie folgt näher definiert sind:

a = 86 % A	6 % C	4 % G	x = c' = 88 % C	6 % G	6 % T
c = 86 % C	6 % A	4 % G	y = g' = 82 % G	11 % C	7 % T
g = 79 % G	8 % A	8 % C	z = t' = 82 % T	11 % C	7 % G
t = 79 % T	8 % A	8 % C			

mit A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin.

25 Das Oligonucleotid Loop1_32 (IBA, Göttingen, Germany) wird anschließend in einer PCR direkt als Primer (unter Punkt 3.1) eingesetzt.

2. Herstellung des Vektors für das Screening

In den Vektor pETBlue-2 (SEQ_ID No. 6) wird, wie in Ausführungsbeispiel 1 (Punkt 1.1. – 1.3.) beschrieben, das Gen für RNase T1 Wildtyp (SEQ_ID No. 3) inklusive des Signalpeptides für eine periplasmatische Expression kloniert und der Vektor pETBlue-

5 RNaseT1-Wildtyp erhalten.

Anschließend wird der Vektor pETBlue-RNaseT1-Wildtyp mit PvuII und SspI (beide MBI Fermentas, Vilnius, Litauen) verdaut:

Ansatz:

10 4 µg pETBlue-2
2 µl 10x Puffer G (MBI)
10 U SspI
10 U PvuII
ad 20 µl H₂O dest.

15 Der Restriktionsverdau-Ansatz wird 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden die Enzyme für 20 min bei 80 °C inaktiviert. Die Produkte werden auf einem 0,8 %igen Agarose-Gel getrennt und die Produktbande bei 2498 bp aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA wird daraufhin mittels des QIAquick Gel-Extraktions-Kit (Qiagen, Hilden) 20 reisoliert. 200 fmol des isolierten Fragmentes werden in einer Ligation rezirkularisiert:

Ansatz: 200 fmol Fragment
25 2 µl 10x Ligase-Puffer (MBI)
2 µl 50 % PEG (MBI)
1 µl T4-DNA-Ligase
ad 20 µl H₂O dest.

Der Ansatz wird 8 h bei 16 °C inkubiert und anschließend wird das Enzym durch 10-minütige Inkubation bei 65 °C inaktiviert. 1 µl dieses Ansatzes wird direkt zur 30 Transformation kommerziell erhältlicher kompetenter ElectroTen-Zellen (Stratagene, La Jolla, USA) mittels Elektroporation eingesetzt. Die elektroporierten Zellen wurden auf Festagar-Platten mit Ampicillin ausplatiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Ausgehend von einer resultierenden Einzelkolonie wird das fertige Plasmid mittels des

Plasmid-Reinigungskits QIAprep Minipräparations-Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellervorschrift reisoliert. Das so erhaltene Plasmid wird als pETMini_RNaseT1_Wildtyp bezeichnet.

5 3. Klonierung der Bibliothek RNase T1-Loop1

Mit den beiden Primern Loop1_32 (SEQ_ID No. 9) und A2Hi_PstI (SEQ_ID No. 2) (beide IBA Göttingen) wird ein Teil des für RNase T1 Wildtyp (SEQ_ID No. 3) aus dem Ursprungsvektoren pA2T1 (SEQ_ID No. 5) durch eine PCR unter den nachfolgenden Bedingungen amplifiziert.

10 3.1 PCR:

PCR-Ansatz:	10 µl	10x Taq-Puffer (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen)
	2 µl	dNTPs (je 10 mmol/Liter)
	100 pmol	Primer Loop1_32 (wie aus Punkt 1)
	100 pmol	Primer A2Hi_PstI (SEQ_ID No. 2)
15	1 µl	Ursprungsvektor (20 ng) (SEQ_ID No. 5)
	2 U	Taq-Polymerase (MBI)
	ad 100 µl	H ₂ O dest.

Temperaturprofil der PCR: 2 min / 94 °C

20	1.	45 sec / 94 °C (Denaturierung)	30 x
	2.	45 sec / 57 °C (Anlagerung)	
	3.	30 sec / 72 °C (Elongation)	
		2 min / 72 °C	

25 Die resultierenden PCR-Produkte werden mittel des QIAquick PCR-Reinigungs-Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellervorschrift gereinigt.

3.2 Restriktionsverdau:

Zur Klonierung der Bibliothek in den Expressionsvektor pETMini_RNaseT1_Wildtyp

30 werden das PCR-Produkt und der Vektor mittels Restriktionsendonukleasen BamHI und PstI (alle MBI Fermentas, Vilnius, Litauen) wie folgt inkubiert:

Restriktionsverdau-Ansätze:

PCR-Produkte:

5	2 µg	PCR-Produkt	4 µg	pETMini_RNaseT1_Wildtyp
	2 µl	10x Puffer G ⁺ (MBI)	2 µl	10x Puffer G ⁺ (MBI)
	10 U	BamHI	10 U	BamHI
	10 U	PstI	10 U	PstI
	ad 20 µl	H ₂ O dest.	ad 20 µl	H ₂ O dest.

Vektor:

10 Die Restriktionsverdau-Ansätze werden 2 h bei 37 °C inkubiert. Zu dem „Vektor-
Ansatz“ wird anschließend zur Dephosphorylierung 1 U SAP (MBI Fermentas, Vilnius,
Litauen) hinzu gegeben und für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend
werden die Enzyme für 20 min bei 80 °C inaktiviert. Die Produkte werden auf einem
0,8 %igen Agarose-Gel getrennt und bei dem Vektoransatz die Produktbande bei 2608
15 bp und bei dem PCR-Ansatz die Produktbande bei 259 bp aus dem Gel ausgeschnitten.
Die DNA wird daraufhin mittels des QIAquick Gel-Extraktions-Kit (Qiagen, Hilden)
aus den Gel-Stücken reisoliert.

3.3 Ligation, Transformation in *E. coli* und Plasmid-Reisolation

Die Vektor-DNA und das PCR-Produkt werden durch die Inkubation mit T4-DNA-Ligase wie folgt miteinander verbunden:

Ligase-Ansatz:	200 fmol	Vektor-DNA
	600 fmol	PCR-Produkt
	3 µl	10x Ligase-Puffer (MBI)
	1 µl	T4-DNA-Ligase
	ad 30 µl	H ₂ O dest.

Die Ansätze werden 8 h bei 16 °C inkubiert und anschließend wurde das Enzym durch 10-minütige Inkubation bei 65 °C inaktiviert. Die Enzyme werden mit 2-maligen Ausschütteln mit Phenol/Chloroform aus der Lösung entfernt und die erhaltene wässrige Lösung durch Zugabe des 2,5-fachen Volumens Ethanol durch Inkubation für 1 h bei -20 °C gefällt. Der Ansatz wird anschließend 30 min bei 13000 Upm, 4 °C zentrifugiert und das Pellet in 50 µl 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach einer weiteren 15 minütigen Zentrifugation bei 13000 Upm, 4 °C wird der Ethanol abgenommen und

das DNA-Pellet getrocknet. Anschließend wird die DNA in 3 µl H₂O dest. aufgenommen direkt zur Transformation kommerziell erhältlicher kompetenter ElectroTen-Zellen (Stratagene, La Jolla, USA) mittels Elektroporation eingesetzt. Von den elektroporierten Zellen werden 10 µl auf Festagar-Platten mit Ampicillin ausplatiert
5 und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Der Rest der elektroporierten Zellen wird direkt in 100 ml Flüssigmedium (LB-Medium: 10 g Trypton, 5 g Hefe-Extrakt (alles Becton Dickinson, Heidelberg), 10 g NaCl (Sigma, Deisenhofen)) mit Ampicillin verdünnt und ebenfalls über Nacht inkubiert. Die Kolonien auf der Festagar-Platte werden ausgezählt und aus dem Wert die Größe der Gesamtbibliothek bestimmt. Ausgehend von 5 ml der
10 in Flüssigkultur gewachsenen Klonmischung wird die fertige Plasmid-Bibliothek mittels des Plasmid-Reinigungskits QIAprep Minipräparations-Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellervorschrift reisoliert. Als Resultat erhält man eine Bibliothek aus bis zu 10⁷ verschiedenen RNaseT1_Loop1_Varianten: pETMini_RNaseT1_L1.

3.4 Herstellung des Expressionsstammes:

15 Für die Expression der RNase T1-Testbibliothek wird ein *E. coli* Stamm benötigt, bei dem die RNase I ausgeschaltet ist. Entsprechende Stämme, wie z. B. AT9 (rna-19 λ⁻ gdhA2 relA1 spotT1 metB1) sind über das *E. coli* Genetic Stock Center New Haven, USA verfügbar. Der im Beispiel verwendete Expressionsvektor pETBlue-2 benötigt zusätzlich die T7-RNA-Polymerase für die Expression, welche in *E. coli* nicht
20 vorhanden ist. Mit dem kommerziell erhältlichen λDE3-Lysogenisierungs-Kit (Novagen, Madison, USA) wird nach Herstellervorschrift das T7-RNA-Polymerase codierenden Gen in den *E. coli* Stamm AT9 eingeführt. Hierdurch erhält man einen *E. coli* Stamm, der sich durch die Abwesenheit von RNase I und das Vorhandensein der T7-RNA-Polymerase (DE3) auszeichnet. Von diesem Stamm wurden mittels Standard-
25 Molekularbiologie-Methoden elektrokompetente Zellen hergestellt und bei -80 °C gelagert.

3.5 Transformation des Expressionsstammes mit der Bibliothek:

In den wie oben beschrieben hergestellten Expressionsstamm wird 1 ng der Bibliothek pETMini_RNaseT1_L1 mittels Elektroporation transformiert und die resultierenden
30 Zellen nach 1-stündigem Wachstum bei 37 °C in 200 ml Flüssigmedium (LB-Medium:

10 g Trypton, 5 g Hefe-Extrakt (alles Becton Dickinson, Heidelberg), 10 g NaCl (Sigma, Deisenhofen)) mit Ampicillin aufgenommen.

10 ml der so erhaltenen Vorkultur werden sofort auf eine 96-Well Mikrotiterplatte (MTP) aufgeteilt (je 100 µl pro well) und über Nacht bei 30 °C und 800 Upm inkubiert.

5 Dadurch werden ca. 150.000 Klone auf der MTP erhalten.

3.6 Wachstum der Hauptkultur und Expression von RNase T1

Eine 96er Deepwellplatte (DWP) wird mit jeweils 1,5 ml Flüssigmedium mit Ampicillin pro Well befüllt. Das Medium wird mit jeweils 50 µl aus der Vorkultur-

10 MTP beimpft und die DWP bei 37 °C und 800 Upm kultiviert. Beim Erreichen einer optischen Dichte OD₆₀₀ der Kulturen von OD₆₀₀ = 1,0 werden die Kulturen mit 1 mmol/Liter IPTG induziert. Anschließend wird die Platte für weitere 4 h bei 37 °C und 800 Upm inkubiert.

3.7 Präparation der Protein-Proben

15 Durch das Signalpeptid ompA werden die exprimierten RNase T1 – Moleküle in den periplasmatischen Raum des Expressionsbakteriums geleitet. Durch einen osmotischen Schock können die Proteine sehr leicht präpariert werden. Die Reinigungsprozedur umfasst dabei folgende Schritte:

- Sammeln der Zellen durch Zentrifugation bei 4000 Upm, 4 °C für 5 min
- Abschütten des Medien-Überstandes
- Resuspension des Bakterienpellets in jeweils 25 µl Puffer A (50 mmol/Liter Tris/HCl, pH 7,5, 10 mmol/Liter EDTA, 15 % Saccharose w/v)
- Inkubation auf Eis für 30 min
- Zugabe von jeweils 125 µl Puffer B (50 mmol/Liter Tris/HCl, pH 7,5, 10 mmol/Liter EDTA)
- Zentrifugation bei 4000 Upm, 4 °C, für 20 min
- Abnahme des Überstandes und Überführung in eine MTP (Periplasma)
- Aufbewahren der Bakterienpellets

3.8 Herstellung des Substrates für RNase T1

Als Substrat (Sub_A) dient ein doppelsträngiges DNA-Molekül mit zentralem einzelsträngigen Bereich, welcher nun einen Adenosin-RNA-Baustein (rA) als Angriffspunkt für das Enzym enthält. Die Enden dieses Substrates sind mit unterschiedlichen Farbstoffen für den roten (Cy5 am 5'-Ende) und den grünen (RhG - am 3'-Ende) Spektralbereich markiert. Um ein Ausbleichen der markierten Substrate zu verhindern, werden die entsprechenden Lösungen und Inkubationsansätze stets vor Licht geschützt. Die Puffer und Ansätze werden mit DEPC-behandeltem Wasser hergestellt. Das Substrat setzt sich aus den folgenden 3 Oligonucleotiden (IBA 5 Göttingen) zusammen:

1. Sub_A:

5'-Cy5-CCATACCCAGCCAGCCACAArACAAGCCACCGAAGCACAGATA-RhG-3'
(SEQ_ID No. 11)

2. T1_Sub_Li:

15 5'-GTGGCTGGCTGGTATGGA-3' (SEQ_ID No. 7)

3. T1_Sub_Re:

5'-TATCTGTGCTTCGGTGGC-3' (SEQ_ID No. 8)

Durch die nachfolgend beschriebene Hybridisierung werden die 3 Bestandteile wie folgt zu einem doppelsträngigen Substrat aneinander angelagert:

20 Hybridisierungs-Ansatz: Hybridisierungs-Programm:

1000 pmol Sub_A

1. 10 s 94°C;

1200 pmol T1_Sub_Li

2. Abkühlen auf 25 °C mit 0,1 °C/s

1200 pmol T1_Sub_Re

3. 4 °C

20 µl MES (1 mol/Liter, pH 6,0)

25 ad 1000 µl DEPC-H₂O

3.9 Inkubation der Protein-Proben mit dem Substrat

In einer MTP werden jeweils 10 µl des doppelsträngigen Substrates pro Well vorgelegt. Dazu werden jeweils 10 µl der aus dem Periplasma isolierten Protein-Proben 30 hinzugegeben, die MTP luftdicht verschlossen und dunkel für 24 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden jeweils 5 µl dieser Ansätze in eine MTP mit Glasboden überführt

und mit jeweils 250 µl Puffer C (100 mmol/Liter MES, pH 6,0, 100 mmol/Liter NaCl, 2 mmol/Liter EDTA) gemischt.

3.10 Aktivitätsbestimmung

Zur Bestimmung der Enzymaktivität wird die Platte mit Glasboden, in die die

5 Inkubationsansätze wie unter 1.10 beschrieben überführt wurden, am Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskop ConfoCor 2 (Evotec Biosystems, Hamburg und Carl Zeiss Microscopy, Jena) vermessen. Die Auswertung der Daten erfolgt mit der ConfoCor 2-Software (Version 2.5).

Für die Messungen wird ein Argon-Laser ($\lambda = 488$ nm) zur Anregung von RhG in 10 Kombination mit einem Helium/Neon-Laser ($\lambda = 633$ nm) für Cy5 eingesetzt. Das FCS-Messvolumen in den Kavitäten wurde 200 µm über der Glasbodenoberfläche justiert. Die Messungen erfolgen für 20 s pro Well.

Durch eine Kreuzkorrelationsanalyse der erhaltenen Daten kann auf eine eventuelle Spaltung des Substrates geschlossen werden. Eine Spaltung des Substrates durch RNase 15 T1 führt zu einer Entkopplung der beiden Fluoreszenzfarbstoffe und somit zum Verlust des Kreuzkorrelationssignales. Ungeschnittene Substrat-Moleküle tragen hingegen beide Farbstoffe und liefern ein hohes Signal.

Fig. 2 zeigt die so erhaltenen Messdaten für ein nach Ausführungsbeispiel 2 hergestellte 20 RNase T1-Loop1-Bibliothek bestehend aus 150.000 Klonen auf einer Platte. Die RNase T1-Aktivität wurde wie oben beschrieben mittels Kreuzkorrelationsanalyse detektiert. Für eine bessere Übersicht wurde eine reziproke Darstellung gewählt, d.h. hohe Peaks bedeuten ein niedriges Signal und niedrige Peaks ein hohes Signal. Fig. 2 zeigt einen sehr deutlichen Peak, die durch einen Verlust des Kreuzkorrelationssignales 25 hervorgerufen wird. Der Peak zeigt, dass in dem Experiment eine RNase T1-Aktivität, welche nun ein Substrat nach A spalten kann, in einem von 96 Wells vorhanden war.

4. Reisolation der Teilbibliothek

In der nach Ausführungsbeispiel 2 (Punkte 1. – 3.10.) erhaltenen Platte mit den 30 aufbewahrten Bakterienpellets aus der Proteinpräparation wird in dem Well, welche in der Aktivitätsbestimmung (3.10) eine RNase T1-Aktivität nach Adenosin gezeigt hat,

eine Plasmidpräparation mittels dem QIAprep Minipräparations-Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt.

Durch die ursprüngliche Aufteilung von 150.000 Klonen auf die Platte ergab sich eine Anzahl von $150.000 / 96 = 1563$ unterschiedlichen Klonen pro Well.

5 5.1 Weitere Vereinzelungen – 1. Schritt

Durch eine Transformation von verschiedenen Aliquots der so erhaltenen Teilbibliothek analog der vorgehensweise von Ausführungsbeispiel 1 (Punkt 1.6) wurde die Menge von Plasmid-DNA bestimmt, welche notwendig ist, um nun ca. 5.000 transformierte Klonen mittels Elektroporation zu erhalten.

10 Anschließend wurde die bestimmte Menge der Teilbibliothek in den Expressionsstamm transformiert und das gleiche Verfahren wie für die ursprüngliche Bibliothek durchlaufen.

Da in dem ursprünglichen Well 1563 unterschiedliche Klonen vorhanden waren und ca. 5000 Klonen aufgeteilt wurden, sollte der die Adenosin-spaltende Aktivität zeigende 15 Klonen ca. 3-mal zu finden sein.

20 **Fig. 3** zeigt die erhaltenen Daten für diese Teilbibliothek. Es wurde ein Well mit einer sehr hohen Aktivität und drei weitere mit ebenfalls noch deutlich vom Hintergrund unterscheidbarer Aktivität detektiert, so dass der Klon 4-mal auf der Platte vorhanden war. Das Well mit dem höchsten Aktivitätswert wurde für den weiteren Vereinzelungsschritt ausgewählt. In diesem Well waren nun mehr noch $5000 / 96 = 52$ unterschiedliche Klonen vorhanden. Die Plasmide wurden wiederum in diesem Well aus dem Bakterienpellet reisoliert.

25 5.2 Weitere Vereinzelungen – 2. Schritt

30 Eine weitere Wiederholung des dargestellten Schemas mit einer Aufteilung von jetzt ca. 500 Klonen ergab eine nochmals angereicherte Teilbibliothek mit durchschnittlich $250 / 96 = 5,2$ Klonen pro Well. Der die Aktivität verursachende Klon konnte auf dieser Platte 10-mal wieder gefunden werden (**Fig. 4**). Von einem der Aktivität zeigendem Wellen wurden wiederum die Plasmide aus dem Bakterienpellet isoliert.

5.3 Weitere Vereinzelungen – 3. Schritt

Ein Aliqout dieser Plasmidmischung wurde in den Expressionsstamm elektroporiert und die Transformanten auf einer Festagar-Platte ausgestrichen und die Platte über Nacht bei 37 °C inkubiert. Von den gewachsenen Einzelklonen wurden 20 ausgewählt und damit 5 direkt 100 µl Vorkulturen in einer MTP wie in 3.5. angesetzt. Nach Durchlaufen der Schritte 3.6.-3.10. konnte die detektierte Aktivität nun einem Einzelklon zugeordnet werden und der Genotyp der Adenosin-spaltenden RNaseT1-Variante identifiziert werden.

Abkürzungsverzeichnis:

In der Erfindungsbeschreibung werden folgende Abkürzungen verwendet:

	<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
5	<i>C. lucknowese</i>	<i>Chrysosporium lucknowese</i>
	Cy5	Fluoreszenzfarbstoff Cy5 TM (Amersham Biosciences UK Limited, Little Chalfont, Buckinghamshire, GB)
	DEPC	Diethylpyrocarbonat
	DWP	Deepwellplatte
10	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
	h	Stunde
	IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalacto-pyranosid
	LB	Luria Broth
15	MES	Morpholinoethansulfonsäure
	min	Minuten
	MTP	Microtiterplatte
	OD	optische Dichte
	OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
20	ompA	äußeres Membranprotein A aus <i>E. coli</i>
	p	Plasmid
	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
	PT7	T7-Promotor
	rA	Riboadenylysäurerest
25	rG	Riboguanylysäurerest
	Upm	Umdrehungen pro Minute
	RhG	Rhodamin Grün (Fluoreszenzfarbstoff)
	SAP	Alkalische Phosphatase aus Krabben
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Hefe)
30	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
	T4	vom Bakteriophage T4 abstammend
	U	Unit (Einheit für Enzymaktivität)
	w/v	bei Prozentangaben: Gewicht (w = weight) pro Volumen (v)

Patentansprüche

1. Verfahren zur Selektion von Biomolekülen aus Varianten-Bibliotheken von Biomolekülen umfassend die Schritte:

5 a.) Herstellung einer Varianten-Bibliothek, bestehend aus einer Anzahl (B_0) von Varianten, die für das Biomolekül codierenden Gensequenz, und

b.) Aufteilung der Variantenbibliothek in eine Anzahl von Kompartimenten (W_0), die mindestens um einen Faktor 10 kleiner ist, als die Anzahl (B_0) der in der Varianten-Bibliothek enthaltenen Varianten,

10 wobei jedes Kompartiment eine Teilbibliothek enthält, die $K_0=B_0/W_0$ Varianten enthält,

15 c.) Produktion von Biomolekülen in den Kompartimenten, und Test der in den einzelnen Kompartimenten erhaltenen Biomoleküle auf eine bestimmte Eigenschaft (Phänotyp), wobei aus dem beobachteten Phänotyp keine direkten Rückschlüsse auf den Genotyp möglich sind,

d.) Auswahl mindestens eines Kompartiments, in dem Biomoleküle enthalten sind, welche die gewünschten Eigenschaften erfüllen,

e.) Aufteilung der in dem ausgewählten Kompartiment enthaltenen Teilbibliothek in weitere Kompartimente und

20 f.) n-faches Wiederholen der Schritte c.) bis e.) bis in jedem Kompartiment nur noch maximal eine Variante ($K_n \leq 1$) der für das Biomolekül codierenden Gensequenz enthalten ist.

25 2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** die gewünschte Eigenschaft eine biokatalytische Aktivität ist.

30 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet, dass** in Schritt c.) auch eine Vervielfältigung der Teilbibliothek in den Kompartimenten bis zu einer Individuen-Anzahl $V_0(x)$ zum Zeitpunkt x pro Kompartiment erfolgt, wobei die Individuen-Anzahl $V_0(x)$ dividiert durch die Klonanzahl pro Kompartiment K_0 den Vervielfältigungsfaktor $F_0(x)$ pro Klon ergibt.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet, dass** in Schritt e.) die Aufteilung unter Verdünnung der Teilbibliothek anhand des Faktors $F_0(x)$ erfolgt, so dass in einem gegebenen Volumen jeder in dem Kompartiment enthaltene Klon statistisch bis zu einer Anzahl $X_0 < W_1$ vorkommt, dieses Volumen wird auf neue Kompartimente der Anzahl W_1 aufgeteilt, wobei die neue Klonanzahl pro Kompartiment $K_1 = X_0 * K_0 / W_1$ beträgt.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet, dass** Variantenbibliothek 10^3 bis 10^{15} Varianten der Gensequenz des Biomoleküls enthält.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Variantenbibliothek im Schritt b.) auf 10^1 bis 10^4 Kompartimente aufgeteilt wird.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Variantenbibliothek vor der Aufteilung im Schritt b) in einen Organismus überführt wird.
8. Verfahren nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Kultur des Organismus nach der Aufteilung im Schritt c.) auf eine Organismenzahl von 10^8 bis 10^9 pro Kompartiment vervielfältigt wird.
9. Verfahren nach Anspruch 7 oder 8, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Organismen auch die Produktion der Biomoleküle durchführen.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 9, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Teilbibliotheken in den Kompartimenten aus den Organismen reisoliert werden und die Produktion der Biomoleküle durch zellfreie Systeme, durchgeführt wird.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Vervielfältigung der Teilbibliotheken und die Produktion der Biomoleküle durch zellfreie Systeme durchgeführt wird.

5 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Variantenbibliothek aus DNA-Plasmiden besteht, welche die für das Biomolekül codierende Gensequenz enthalten.

10 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Variantenbibliothek aus linearen Nukleinsäuremolekülen besteht, welche die für das Biomolekül codierende Gensequenz enthalten.

15 14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Biomoleküle Enzyme oder Ribozyme oder andere Biomoleküle sind, welche eine biokatalytische Aktivität besitzen.

20 15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Test auf eine biokatalytische Aktivität mittels physikalischer Messmethoden, wie vorzugsweise der UV/VIS-Spektroskopie, der Fluoreszenz-Spektroskopie oder der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie, erfolgt.

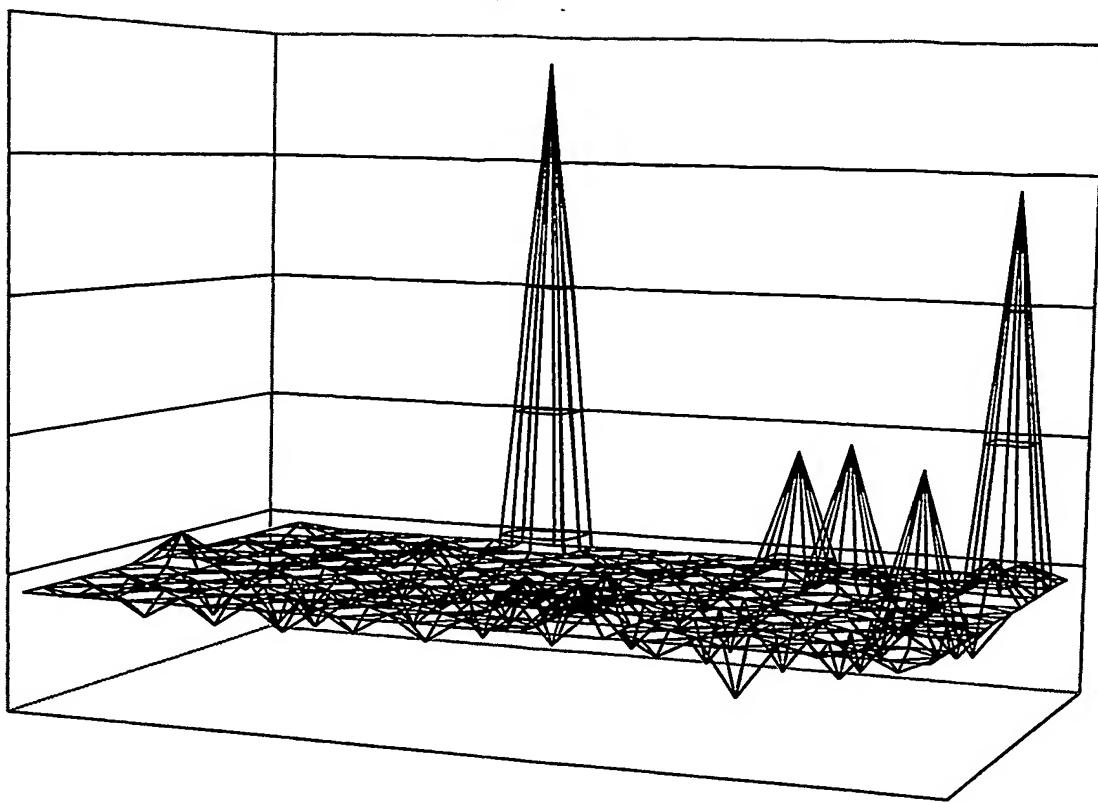


Fig. 1

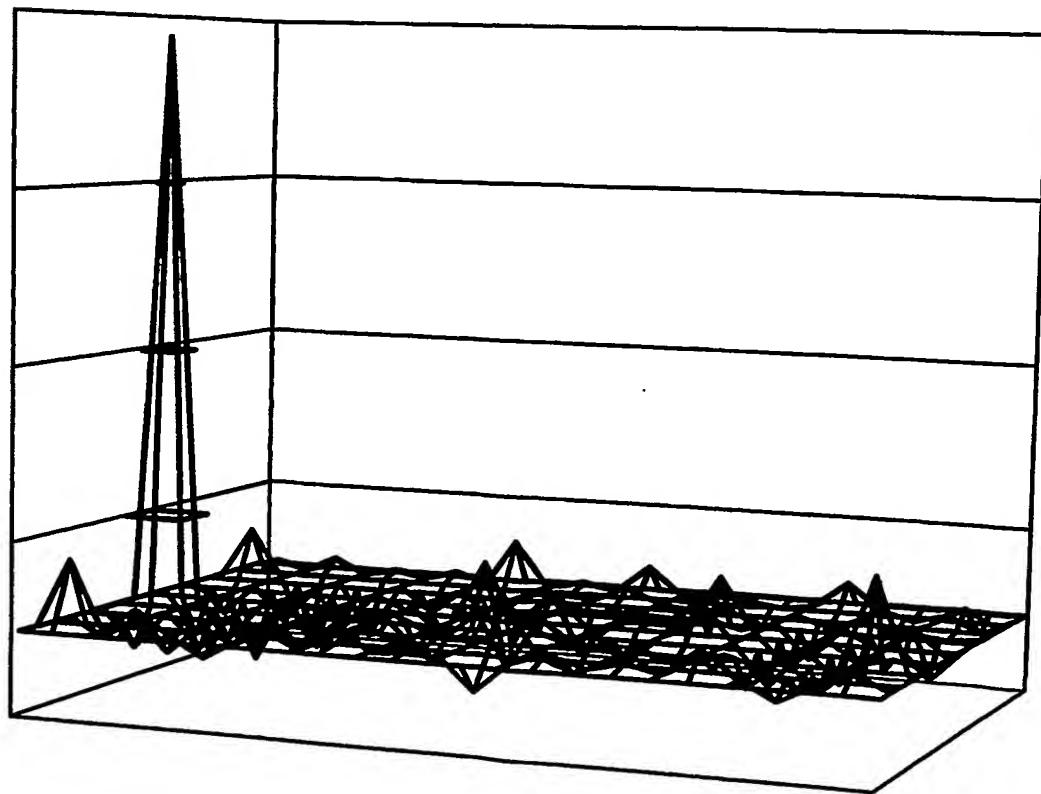


Fig. 2

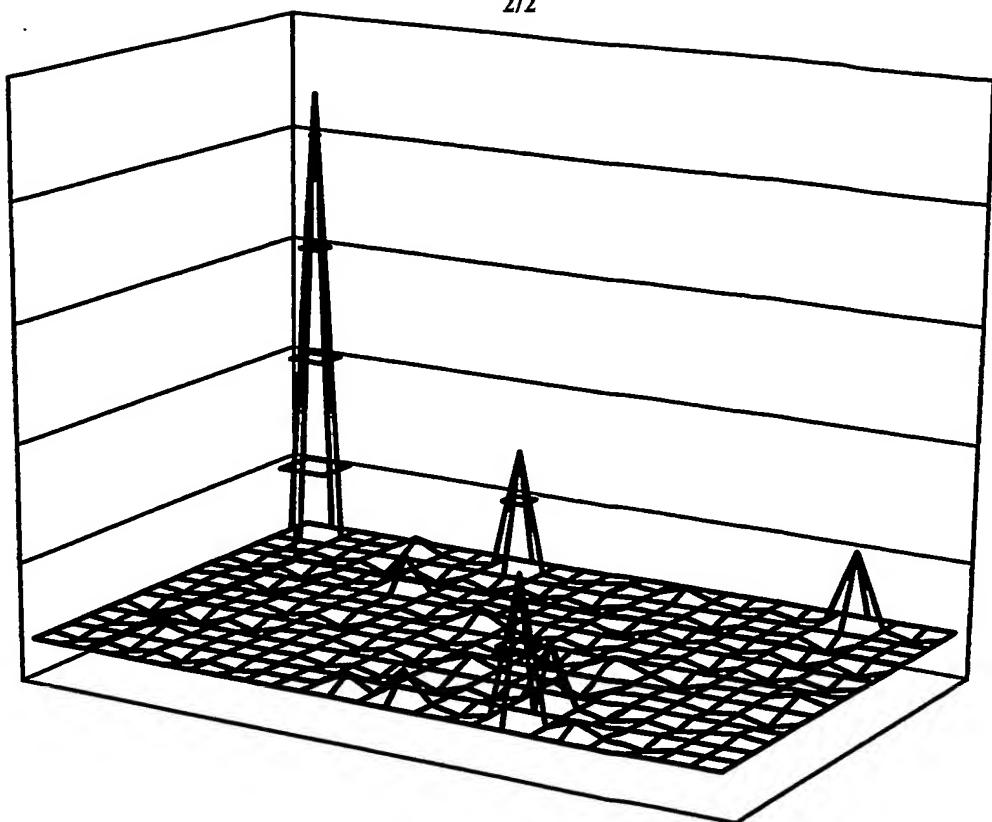


Fig. 3

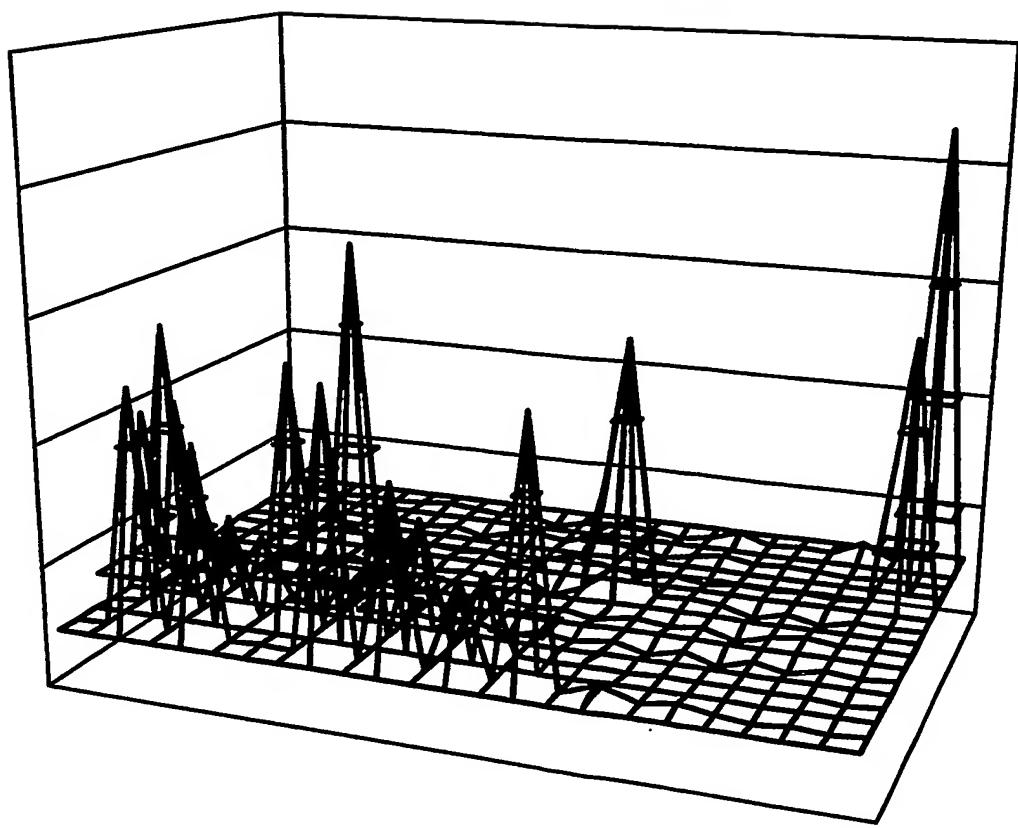


Fig. 4

SEQUENZPROTOKOLL - SEQUENCE LISTING

<110> Universität Leipzig
<120> Verfahren zur Selektion von Biomolekülen aus Varianten-
Bibliotheken von Biomolekülen
<130> 401P03DPCT

<150> DE10350474.5
<151> 2003-10-23

<160> 11
<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 28
<212> DNA
<213> artificial
<400> 1
caattctgca gttgcgttca cgtcgttg

28

<210> 2
<211> 28
<212> DNA
<213> artificial
<400> 2
taaggctcat gaaaaacaca gctatcgc

28

<210> 3
<211> 378
<212> DNA
<213> Escherichia coli
<220>
<221> ompA-Signalpeptid
<222> (1)..(63)
<223>
<220>
<221> RNase T1 Wildtyp
<222> (64)..(378)
<223>
<400> 3

atgaaaaaca cagctatcgc gattgcagtg gcactggctg gtttcgtac cgtagcgcag 60

gccgcatgcg actacacttg cggttctaact tgctactctt cttcagacgt ttctactgct 120

caggcggccg gatataaact tcacgaagac ggtgaaactg ttggatccaa ttcttaccca 180

cacaagtaca acaactacga aggtttgtat ttctctgtga gctctcccta ctacgaatgg 240

cctatccctcgagcgggtga tgtttactct ggtgggtccc cgggtgctga ccgtgtcg 300

ttcaacgaaa acaaccaact agctgggttt atcactcaca ctggtgcttc tggtaacaac 360

ttcgttgaat gtacataa 378

```

<210> 4
<211> 378
<212> DNA
<213> Escherichia coli
<220>
<221> ompA-Signalpeptid
<222> (1)..(63)
<223>
<220>
<221> RNaseT1-His92Ala
<222> (64)..(378)
<223>
<400> 4
atgaaaaaca cagctatcg gattgcagt gcaactggctg gtttcgtac cgttagcgcag      60
gccgcatgcg actacacttg cggttctaac tgctactctt cttcagacgt ttctactgct      120
caggcggccg gatataaact tcacgaagac ggtgaaactg ttggatccaa ttcttaccca      180
cacaagtaca acaactacga aggttttgcat ttctctgtga gctctcccta ctacgaatgg      240
cctatcctct cgagcggta tgtttactct ggtgggtccc cgggtgctga ccgtgtcgtc      300
ttcaacgaaa acaaccaact agctggtggtt atcaactgcca ctggtgcttc tggtaacaac      360
ttcggttgaat gtacataa      378

```

```

<210> 5
<211> 7336
<212> DNA
<213> Plasmid pA2T1
<220>
<221> lac Promotor
<222> (1)..(371)<223>
<220>
<221> ompA-Signalpeptid
<222> (393)..(455)
<223>
<220>
<221> RNaseT1-Wildtyp
<222> (456)..(770)
<223>
<220>
<221> lacI-Gen
<222> (1664)..(2887)
<223>
<220>
<221> ORI
<222> (4924)..(5115)
<223>
<220>
<221> Beta-Lactamase (Amp)
<222> (7165..(6302))
<223>
<400> 5
taggcgtatc acgaggccct ttggataacc agaagcaata aaaaatcaaa tcggatttca      60
ctatataatc tcactttatc taagatgaat ccgatggaag catcctgttt tctctcaatt      120
tttttatcta aaacccagcg ttcgatgctt ctggagcga acgatcaaaa ataagtgcct      180

```

tcccatcaaa	aaaatattct	caacataaaa	aacttttgtt	aatacttgta	acgctacatg	240
gagattaact	caatctagct	agagaggctt	tacactttat	gcttccggct	cgtataatgt	300
gtggaaattgt	gagcgataaa	caatttcaca	caggaaacag	ctatgaccat	gattacggat	360
tcactggaac	tctagataac	gaggcgaaa	aatgaaaaaa	cacagctatc	gcgattgcag	420
tggcaactggc	tggtttcgct	accgtagcgc	aggccgcatg	cgactacact	tgtggttcca	480
actgctactc	ttcttcagac	gtttctactg	ctcaagcggc	cgatataaaa	cttcacgaag	540
acggtgaaac	tgttggatcc	aattcttacc	cacacaaaata	caacaactac	gaagggtttt	600
atttctctgt	gagctctccc	tactacgaat	ggcctatcct	ctcgagcggt	gatgtttact	660
ctggtgggtc	cccggtgct	gaccgtgtcg	tcttcaacga	aaacaaccaa	ctagctggtg	720
ttatcactca	cactggtgct	tctggtaaca	acttcgttga	atgtacataa	gcttggatcg	780
atccgggctg	agcaacgacg	tgaacgcaat	gcgttccgac	gttcaggctg	ctaaagatga	840
cgcagctcgt	gctaaccagc	gtctggacaa	catggctact	aaataccgca	agtaatagta	900
cctgtgaagt	gaaaaatggc	gcacattgtg	cgacatffff	tttgcgtgcc	gtttaccgct	960
actgcgtcac	gcgtAACATA	ttcccttgct	ctggttcacc	attctgcgt	gactctactg	1020
aaggcgcatt	gctggctgcf	ggagttgctc	cactgctcac	cgaaaccgga	taccctgccc	1080
gacgatacaa	cgctttatcg	actaacttct	gatctacagc	cttattgtct	ttaaattgcf	1140
taaaggcctgc	tggcagtgtg	tatggcattg	tctgaacgtt	ctgctgttct	cctgcccata	1200
gtggtcgatg	tacttcaaca	taacgcattcc	cgtaggctc	cacgaaatat	ttcaccgggt	1260
cgttgatcac	tttcaccggc	gttcccgfcc	gcacgctgga	gaacaaggct	ttaatatccg	1320
gtgcattcat	gcaatacacac	cctgaactga	cgcgaaacc	gacgctgtcc	ggcgcaactgg	1380
taccatgaat	gaggtattcg	ccattaccat	gcgcgaggcg	cagtgcgtaa	cgcccttagcg	1440
ggttatttgg	tccggcagga	acgactggcg	gtaatttaat	gccacgctcc	agcgaacgct	1500
gacgaatgcc	tgccgtaggc	gtccagggtt	ggttagggat	tttctgccc	acacgcgttt	1560
ccatcaccgg	cgtttccagc	ccctgcaatc	caatacctat	tggataaaacc	tgcacaaat	1620
tttctcccg	cggataataa	taaaggcgca	gctctgcaag	gttgacacca	tcgaatggcg	1680
caaaacctt	cgcggatgg	catgatagcg	cccggaaagag	agtcaattca	gggtggtgaa	1740
tgtgaaacca	gtaacgttat	acgatgtcg	agagtatgcc	ggtgtcttt	atcagaccgt	1800
ttcccgctg	gtgaaccagg	ccagccacgt	ttctgcgaaa	acgcgggaaa	aagtggaaagc	1860
ggcgatggcg	gagctgaatt	acattccaa	ccgcgtggca	caacaactgg	cgggcaaaca	1920
gtcggtgctg	attggcgttg	ccacccctag	tctggccctg	cacgcggcgt	cgcaaattgt	1980

cgccggcgatt aaatctcgcg ccgatcaact ggggccagc gtggtggtgt cgatggtaga 2040
 acgaagcggc gtcgaagcct gtaaagcggc ggtgcacaat cttctcgcc aacgcgtcag 2100
 tgggctgatc attaactatc cgctggatga ccaggatgcc attgctgtgg aagctgcctg 2160
 cactaatgtt ccggcggtat ttcttgatgt ctctgaccag acacccatca acagtattat 2220
 tttctccat gaagacggta cgcgactggg cgtggagcat ctggtcgcat tgggtcacca 2280
 gcaaatcgcg ctgttagcgg gcccattaag ttctgtctcg gcgcgtctgc gtctggctgg 2340
 ctggcataaa tatctcactc gcaatcaaata tcagccgata gcggAACGGG aaggcgactg 2400
 gagtgccatg tccggtttc aacaaaccat gcaaatgctg aatgagggca tcgttcccac 2460
 tgcgatgctg gttgccaacg atcagatggc gctgggcgca atgcgcgcca ttaccgagtc 2520
 cgggctgcgc gttgggtgcgg atatctcggt agtgggatac gacgataccg aagacagctc 2580
 atgttataatc ccggcgtcaa ccaccatcaa acaggatttt cgcctgctgg ggcaaaccag 2640
 cgtggaccgc ttgctgcaac tctctcaggg ccaggcggtg aagggaatc agctgttgcc 2700
 cgtctcactg gtgaaaagaa aaaccaccct ggcccataat acgcaaaccg cctctccccg 2760
 cgcgttggcc gattcattaa tgcagctggc acgacaggtt tccgactgg aaagcgggca 2820
 gtgagcgcaa cgcaattaat gtgagttagc tcactcatta ggcacccag gctttacact 2880
 ttatgctaac gataatcccc tgacgcggtg catcaggtaa taacagttgt gaaggaatag 2940
 ttatcgtcgt accaggtttt ggcacccggg cgatagtgtt attggcttca aggatcaaca 3000
 ttgccgcagt atcaaaacgt cgggcaatag cctgaaggtt tttatcccct tcttgacccg 3060
 tatacgtttt attttgccta accagtcggc ttccgggtgg tggtagcgga taatcaaccg 3120
 cccaggcagc ctggatggcg ctaaaagcgc cgataagcgt gagtgtaagc aaagacgcgc 3180
 gtttcattgt aaacccctcg tatttgcgg agactcacgc tgaaacgtcg gatggcgctt 3240
 atgttacact gaaaccaaaa cactcctgtg caggtcagtg taaacattga ccatccggca 3300
 atgtgagcca accggatgaa agctgtcctt ttagtttagc taagtgcagc ggctttggcg 3360
 cgaattgcgc gaatcatcgc ttccagacct tgtgaacgag atggggtgag atgttgggtg 3420
 agcgccattt tttcaaacca cggacgcaca tcgaaattga caatatcctg cggcgtcatc 3480
 tgatcgtaga gaataaagac gaccgcaata agccctttca caatcgccgc atcgctgtcg 3540
 ccctgttaatt caataattcc ctggcattc tggcgcatga caatccacac ctgactctga 3600
 cagccctgaa tgctattttg tggacttctg tttcgtcgc gtaattctgg cagacgctgg 3660
 gggaccgatg cccttgagag cttcaaccc agtcagctcc ttccggtggg cgcggggcat 3720
 gactatcgtc gccgcactta tgactgtctt ctatcatg caactcgtag gacaggtgcc 3780
 ggcagcgctc tgggtcattt tcggcgagga ccgccttcgc tggagcgca cgatgatcg 3840

cctgtcgctt	gcggatttcg	gaatcttgc	cgcctcgct	caagccttcg	tcactggtcc	3900	
cggccaccaaa	cgttccggcg	agaagcaggc	cattatcgcc	ggcatggcgg	ccgacgcgct	3960	
gggctacgtc	ttgtctggcgt	tcgcgacgcg	aggctggatg	gccttcccc	ttatgattct	4020	
tctcgcttcc	ggcggcatcg	ggatgcccgc	gttgcaggcc	atgctgtcca	ggcaggtaga	4080	
tgacgaccat	cagggacagc	ttcaaggatc	gtctcggtc	cttaccagcc	taacttcgat	4140	
cactggaccg	ctgatcgta	cggcgattta	tgccgcctcg	gcgagcacat	ggaacgggtt	4200	
ggcatggatt	gtaggcgccg	ccctataacct	tgtctgcctc	cccgcggtgc	gtcgcggtgc	4260	
atggagccgg	gccacactcg	cctgaatgga	agccggcgcc	acctcgctaa	cggattcacc	4320	
actccaagaa	ttggagccaa	tcaattcttg	cgagaaactg	tgaatgcgc	aaccaaccct	4380	
tggcagaaca	tatccatcg	gtccgcac	tccagcagcc	gcacgcggcg	catctcgcc	4440	
agcgttgggt	cctggccacg	ggtgcgcatg	atcgtgc	tgtcggtgag	gaccggcta	4500	
ggctggcggg	gttgccttac	tggtagcag	aatgaatcac	cgatacgcg	gcgaacgtga	4560	
agcgactgct	gctgcaaaac	gtctgcgacc	tgagcaacaa	catgaatgg	cttcggttc	4620	
cgtgtttcgt	aaagtctgga	aacgcggaa	tcagcgc	gcaccattat	gttccggatc	4680	
tgcatcg	catgc	gatgcgt	gctaccctgt	ggaacaccta	catctgtatt	aacgaagcgc	4740
tggcattgac	cctgagt	gttctctgg	tccgcgc	tccataccgc	cagttgttta	4800	
ccctcacaac	gttccagtaa	ccggcgt	tcatcatcag	taaccctat	cgtgagcatc	4860	
ctctctcg	tcatcggtat	cattacccc	atgaacagaa	atccccctta	cacggaggca	4920	
tcagtgc	aacaggaaaa	aaccgcctt	aacatggccc	gctttatcag	aagccagaca	4980	
ttaacgc	tggagaaact	caacgagctg	gacgcggatg	aacaggcaga	catctgtgaa	5040	
tcgcttcac	accacgctg	tgagcttac	cgca	gcgcgtt	cggtgtatgac	5100	
ggtaaaaacc	tctgacacat	gcagctccg	gagacgg	cagttgtct	gtaagcggat	5160	
gcccggagca	gacaagcccg	tcagggcg	tcagcgggt	ttggcgggt	tcggggcgca	5220	
gccatgaccc	agtca	cgatagcg	gtgtatactg	gcttaactat	cgggcatcag	5280	
agcagattgt	actgagagtg	caccatatgc	ggtgt	gaaat	accgcacaga	5340	
gaaaataccg	catcaggcgc	tctccgctt	cctcgctc	tgactcg	cgctcggtcg	5400	
ttcggtcg	g	tcagctact	caaaggcg	aatacgg	tccacagaat	5460	
cagggataa	cgcaggaaag	aacatgtgag	caaaggcc	gaaaaggcc	aggaaccgta	5520	
aaaaggccgc	gttgctggcg	ttttccata	ggctccgccc	ccctgacgag	catcacaaaa	5580	
atcgacgctc	aagtca	gagg	ttgcgaaacc	cgacaggact	ataaagatac	5640	

ccccctggaaag ctccctcgta cgctctcctg ttccgaccct gccgcttacc ggataacctgt	5700
ccgcctttct cccttcggga agcgtggcgc tttctcatag ctcacgctgt aggtatctca	5760
gttcggtgta ggtcggtcgcc tccaagctgg gctgtgtgca cgaacccccc gttcagcccg	5820
accgctgcgc ctatccggta aactatcgta ttgagtccaa cccggtaaga cacgacttat	5880
cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta	5940
cagagttctt gaagtgggtgg cctaactacg gctacactag aaggacagta tttggtatct	6000
gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa aaagagttgg tagctttga tccggcaaac	6060
aaaccaccgc tggttagcggt ggttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcaaaaaaa	6120
aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacgggtc tgacgctcag tggaacgaaa	6180
actcacgtta agggattttg gtcatgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatcctt	6240
taaattaaaa atgaagttttt aaatcaatct aaagtatata ttagttaact tggtctgaca	6300
gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgat ctgtctattt cggtcatcca	6360
tagttgcctg actccccgtc gtgtagataa ctacgataacg ggagggctta ccatctggcc	6420
ccagtgctgc aatgatacccg cgagacccac gtcaccggc tccagattta tcagcaataa	6480
accagccagc cggaaaggcc gagcgcagaa gtggcctgc aactttatcc gcctccatcc	6540
agtctattaa ttgttgccgg gaagctagag taagtagttc gccagttaa agtttgcgc	6600
acgttgcgtc cattgctgca ggcacatcggt tgacgctc gtgtttggat atggcttcatt	6660
tcagctccgg ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgatc ccccatgttg tgcaaaaaaa	6720
cggttagctc cttcggtcct ccgatcggt tcagaagtaa gtggccgca gtgttatcac	6780
tcatggttat ggcagcactg cataattctc ttactgtcat gccatccgtaa agatgtttt	6840
ctgtgactgg ttagtactca accaagtcat tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgagtt	6900
gctcttgccc ggcgtcaaca cgggataata ccgcgcacaca tagcagaact ttaaaagtgc	6960
tcatcattgg aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat	7020
ccagttcgat gtaacccact cgtgcaccca actgatcttc agcatctttt actttcacca	7080
gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgcgc aaaaaaggaa ataaggcga	7140
cacggaaatg ttgaataactc atactcttcc ttttcaata ttattgaagc atttatcagg	7200
gttattgtct catgagcgga tacatattt aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg	7260
ttccgcgcac atttccccga aaagtgcac ctgacgtcta agaaaccatt attatcatga	7320
cattaaccta taaaaaa	7336

<210> 6
<211> 3653
<212> DNA
<213> Plasmid pETBlue-2
<220>
<221> T7-Promotor
<222> (1)..(17)
<223>
<220>
<221> lac Operator
<222> (22)..(42)
<223>
<220>
<221> f1 ORI
<222> (1096)..(1551)
<223>
<220>
<221> Beta-Lactamase (Amp)
<222> (2556)..(1669)
<223>
<220>
<221> pUC ORI
<222> (3206)..(3250)
<223>
<220>
<221> lac Operator
<222> (3606)..(3625)
<223>
<400> 6
taatacgaact cactataggg gaatttgtgag cggataacaa ttcccctcta gacttacaat 60
ttccattcgc cattcaggct gcgcactgt tgggaagggc gatcggtacg ggcttctcg 120
ctattacgcc agcttgcgaa cggtggtgc gctgcaaggc gattaagtt ggtaacgcca 180
ggattctccc agtcacgacg ttgtaaaacg acggccagcg agagatctt attggctagc 240
agaataattt tgtaactt taagaaggag atataccatg gcgatatccc gggagctcg 300
ggatccgaat tctgtacagg cgccctgca ggacgtcgac ggtaccatcg atacgcgttc 360
gaagcttgcg gcccacacgc tgtatacacg tgcaagccag ccagaactcg ctccctgaaga 420
cccagaggat ctcgagcacc accaccacca ccactaatgt taatthaagtt gggcggtgt 480
atcatagtca taatcaatac tcctgactgc gtttagcaatt taactgtgat aaactaccgc 540
attaaagcta ttcgatgata agctgtcaaa catgataatt cttgaagacg aaaggcccta 600
ggctgataaa acagaatttg cctggcggca gtagcgcgg ggtcccacct gacccatgc 660
cgaactcaga agtggaaacgc cgtagcgccg atggtagtgt ggggtctccc catgcgagag 720
tagggaactg ccaggcatca aataaaacga aaggctcagt cgaaagactg ggcccttcgt 780
tttatctgtt gtttgtcggt gaacgctctc ctgagtagga caaatccgcc gggagcggat 840
ttgaacgttg cgaagcaacg gcccggaggg tggcgggcag gacgcccggcc ataaactgccc 900
aggcatcaaa ttaagcagaa ggccatcctg acggatggcc ttttgcgtt tctacaaact 960

cttttgttta tttttctaaa tacattcaaa tttttttccg ctgagcaata actagcataa 1020
 ccccttgggg cctctaaacg ggtcttgagg gttttttgc tgaaaggagg aactataatcc 1080
 ggattggcga atgggacgacg ccctgttagcg ggcattaaag cgccgggggt gtggtggta 1140
 cgccgacggt gaccgctaca cttgccagcg ccctagcgcc cgctcccttc gcttcttcc 1200
 cttccttct cggcacgttc gccggcttcc cccgtcaagc tctaaatcgg gggctccctt 1260
 tagggttccg atttagtgct ttacggcacc tcgaccccaa aaaacttgat tagggtgatg 1320
 gttcacgtag tggccatcg ccctgataga cggttttcg cccttgacg ttggagtcga 1380
 cgttctttaa tagtggactc ttgttccaaa ctggacaac actcaaccct atctcggtct 1440
 attctttga ttataaaggg attttgcga tttcggccta ttggtaaaaa aatgagctga 1500
 tttaacaaaa atttaacgacg aatttaaca aaatattaac gtttacaatt tctggcggca 1560
 cgatggcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaatt aaaaatgaag 1620
 ttttaaatca atctaaagta tatatgagta aacttggtct gacagttacc aatgcttaat 1680
 cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc 1740
 cgtcgtgttag ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat 1800
 accgcgagac ccacgctcac cggctccaga tttatcagca ataaaccagc cagccgaaag 1860
 ggccgagcgc agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaatttttg 1920
 ccgggaagct agagtaagta gttcgccagt taatagtttgcgcaacgttg ttgccattgc 1980
 tacaggcatc gtgggtgtcac gtcgtcggtt tggatggct tcattcagct ccggttccca 2040
 acgatcaagg cgagttacat gatccccat gttgtcaaa aaagcggta gtccttcgg 2100
 tcctccgatc gttgtcagaa gtaagttggc cgcgtgtta tcactcatgg ttatggcagc 2160
 actgcataat tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta 2220
 ctcaaccaag tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgtctt gcccggcgtc 2280
 aatacggat aataccgcgc cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg 2340
 ttcttcgggg cgaaaactct caaggatctt accgctgttg agatccagtt cgatgttaacc 2400
 cactcgtgca cccaaactgtat cttcagcatc ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc 2460
 aaaaacagga aggcaaaaatg ccgcaaaaaaa gggataaagg gcgcacacgga aatgttgaat 2520
 actcataactc ttcccttttc aatcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttcttccac 2580
 tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatcctt ttttctgcgc 2640
 gtaatctgct gttgcaaac aaaaaaaccg ccgttaccag cgggggttttgc ttggccggat 2700
 caagagctac caactcttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgcgca gataccaaat 2760
 actgtcgttc tagtgttagcc gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct 2820

acataacctcg ctctgctaat cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt	2880
cttaccgggt tggactcaag acgatagttt ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg	2940
gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct acaccgaact gagataccct	3000
cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggaa gaaaggcggaa caggtatccg	3060
gtaagcggca gggtcggAAC aggagagcgc acgaggggagc ttccaggggaa aaacgcctgg	3120
tatcttata gtccctgtcggtt gtttcggccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtatgc	3180
tcgtcagggg ggccggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggcctttt acggttcctg	3240
gcctttgct ggccctttgc tcacatgttc tttcctgcgt tatccctga ttctgtggat	3300
aaccgtattt ccgccttta gtgagctgtat accgctcgcc gcagccgaac gaccgagcgc	3360
agcgagtcag tgagcggagga agccggcgat aatggcctgc ttctcgccga aacgtttgg	3420
ggcgggacca gtgacgaagg cttgagcgag ggcgtgcaag attccgaata ccgcaagcga	3480
caggccgatc atcgctcgcc tccagcgaaa gcggtcctcg ccgaaaatga cccagagcgc	3540
tgccggcacc tgccttacga gttgcatgtat aaagaagaca gtcataagtgc cggcgacgac	3600
cggtgaattt tgagcgtca caattctcgat gacatcataaa cgtcccgccaa aat	3653

<210> 7
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> artificial
 <400> 7
 gtggctggctt ggtatgga

18

<210> 8
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> artificial
 <400> 8
 tatctgtgct tcggggc

18

<210> 9
 <211> 98
 <212> DNA
 <213> artificial
 <220>
 <223> Primer Loop1_32
 <220>
 <223> compositions of n and b are further specified in the description
 <400> 9
 gttaggatcca attcttaccc acacnnbnnb nnbnnbnnb nnbnnbnnbnn bnnbnnbnnb
 nnbnnbnnbnn nbnnbgaatg gcctatcctc tcgagcgg

60

98

<210> 10
<211>
<212> DNA
<213> artificial
<220>
<223> substrate "Sub_G"
<220>
<223> the g at position 24 is a ribonucleotide
<400> 10
ccataccagc cagccacaag caagccacccg aagcacagat a

41

<210> 11
<211>
<212> DNA
<213> artificial
<220>
<223> substrate "Sub_A"
<220>
<223> the a at position 24 is a ribonucleotide
<400> 11
ccataccagc cagccacaag caaaccacccg aagcacagat a

41